

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Suzana Sršen Medančić

UTJECAJ MUCINA 1 NA FUNKCIJU DECIDUALNIH CD14⁺
ANTIGEN PREDOČNIH STANICA RANE TRUDNOĆE

Doktorski rad

Rijeka, 2011.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Gordana Laškarin,
Akademik Daniel Rukavina

**Doktorski rad obranjen je dana 16. lipnja na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:**

- 1. Prof. dr. sc. Maja Krašević**
- 2. Prof. dr. sc. Sabina Rabatić**
- 3. Prof. dr. sc. Oleg Petrović**
- 4. Prof. dr. sc. Gordana Laškarin**
- 5. Akademik Daniel Rukavina**

Rad ima 204 lista.

UDK: 618.2/.3:618.345:616-008.9-097.3:616-091.811(043)

PREDGOVOR

Istraživanje provedeno u sklopu ovog doktorskog rada financirano je iz projekata „Imunoregulacijske funkcije antigen predočnih stanica tijekom rane trudnoće” (broj 062-0620402-0377; voditeljica prof. dr. sc. Gordana Lašakrin) i „Citokini i citolitički mehanizmi tijekom rane trudnoće”(broj 062-0620402-0376; voditelj akademik Daniel Rukavina) koje financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. Navedeni projekti dio su znanstvenog programa "Imuno-endokrini mehanizmi na majčino-fetalnom spoju tijekom rane trudnoće" voditelja akademika Daniela Rukavine, kojeg također financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

Zahvaljujem svojim mentorima, Prof. dr. sci. Gordani Lašakrin, na bezbrojnim savjetima, uputama, podršci i beskrajnom strpljenju u svim fazama izrade rada, i Akademiku Danielu Rukavini na konkretnim sugestijama u ključnim trenucima.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za Fiziologiju i Imunologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci na svesrdnoj pomoći.

Hvala mojim roditeljima na potpori tijekom svih godina školovanja.

Mojim najmilijima, Uni i Andriji, najveće hvala što ste uvijek uz mene.

SAŽETAK

Cilj istaživanja: Kako bismo bolje razumjeli razloge uklanjanja mucina 1 (MUC1) na mjestu implantacije, istraživali smo njegov utjecaj na decidualne CD14⁺ stanice prvog tromjesečja trudnoće i njihovo međudjelovanje s decidualnim stanicama NK.

Materijali i metode: Internalizacija FITC-dekstran, određivanje površnih i unutarstaničnih biljega, proliferacija CD14⁺ i/ili CD56⁺ stanica i citotoksičnost CD56⁺ stanica prema CD14⁺ stanicama određivani su pomoću protočnog citometra. Lučenje kemokina iz decidualnih CD14⁺ stanica određivali smo metodom ELISA. Magnetsko izdvajanje koristili smo za pročišćavanje decidualnih CD56⁺ i CD14⁺ stanica.

Rezultati: Decidualne CD14⁺ stanice izražavaju zanemariv postotak CD1a i CD83, neznatno izražavaju CD16, dok u znatnoj mjeri izražavaju manozni receptor (MR) i DC-SIGN, pro-upalni kemokinski receptor 5 (CCR5) i receptor mamilicu, CD163, u usporedbi s CD14⁺ stanicama periferne krvi. Stimulacija decidualnih CD14⁺ stanica lipopolisaharidom nije utjecala na internalizaciju FITC-dekstana. MUC1 se veže i internalizira pomoću MR na način ovisan o koncentraciji, povećava izražaj IL-1 receptora tip II i smanjuje izražaj IL-15 u decidualnim CD14⁺ stanicama. U prisustvu makrofaga stimuliranih s MUC1 smanjuje se proliferacija i izražaj citotoksičnih medijatora u stanicama NK, dok se povećava stvaranje protu-upalnog kemokina CCL17. Stanice NK pomoću perforina, NKp30, NKp44 i NKp46 ubijaju decidualne CD14⁺ stanice. Decidualne CD56⁺ stanice ubijaju CD14⁺ stanice stimulirane lipopolisaharidom i MUC1 učinkovitije nego nestimulirane stanice.

Zaključak: MUC1 podupire alternativnu aktivaciju decidualnih CD14⁺ stanica koje mogu ograničiti proliferaciju NK stanica siromašnih s citotoksičnim medijatorima. Uklanjanje MUC1 iz decidue tijekom i nakon implantacije mogao bi doprinjeti boljoj kontroli prodiranje trofoblasta posredstvom stanica NK.

Ključne riječi: Citokini; decidua; makrofagi; manozni receptor; mucin 1; trudnoća

SUMMARY

Objectives: To better understand the reasons for mucin 1 (MUC 1) removal beneath the embryo implantation we investigated influence of (MUC1 on early pregnancy decidual CD14⁺ cells and their interaction with decidual NK cells.

Methods of the study: FITC-dextran internalisation, antigens detection, chemokine secretion, proliferation of CD14⁺ and/or CD56⁺ cells and cytotoxicity of CD56⁺ cells against CD14⁺ cells was analysed by flow cytometry. ELISA was used to detect chemokine secretion in decidual CD14⁺ cells. Magnetic separation was used for purification of decidual CD56⁺ and CD14⁺ cells.

Results: Decidual CD14⁺ cells express negligible percentage of CD1a and CD83, show low CD16 expression, higher mannose receptors (MR) and dendritic cell specific intracellular adhesion molecule grabbing nonintegrin (DC-SIGN), pro-inflammatory chemokine CC receptor 5 (CCR5) and decoy CD163 receptor expression, compared with peripheral blood counterparts. Lypopolysaccharide stimulation did not affect FITC-dextran internalisation in decidual CD14⁺ cells. MUC1 binds and internalises on a dose dependent manner for MR, increases decoy IL-1 receptor type II and decreases IL-15 expression in decidual CD14⁺ cells. In the presence of MUC1 treated macrophages, proliferation and cytotoxic mediators' expression in NK cells attenuated, anti-inflammatory chemokine CCL17 increased. NK cells use perforin and NRC in cell mediated cytotoxicity against CD14⁺ cells. Decidual CD56⁺ cells kill LPS and MUC1 stimulated decidual CD14⁺ cells efficiently than unstimulated cells.

Conclusion: MUC1 supports alternative activation of decidual CD14⁺ cells with a properties to restrict proliferation of NK cells poor with cytotoxic mediators. MUC 1 removal from decidual tissue during and after implantation might contribute to better control of trophoblast invasion by NK cells.

Key words: Cytokines; Decidua; macrophages; mannose receptor; mucin 1; pregnancy

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	
1.1. Spoj majčinih i fetalnih tkiva kao imunološki privilegirano mjesto	1
1.2. Decidualizacija i implantacija	3
1.3. Pregradnja spiralnih arterija	7
1.4. Mucini	9
1.4.1. Mucin1	11
1.4.2. MUC 1 u reproduktivnom sustavu	12
1.4.3. Nadziranje izraženosti MUC1 u ženskom reproduktivnom sustavu	15
1.4.4. Uklanjanje MUC1 tijekom peri-implantacijskog razdoblja	15
1.4.5. Imunološka uloga MUC1 na spoju majčinih i fetalnih tkiva	16
1.4.6. Uloga MUC1 u patološkim trudnoćama	18
1.5. Leukociti na spoju majčinih i fetalnih tkiva	18
1.5.1. Makrofagi	19
1.5.1.1. Podvrste makrofaga	20
1.5.1.2. Biološka uloga makrofaga	21
1.5.2. Makrofagi na spoju majčinih i fetalnih tkiva	24
1.5.2.1. Smještaj makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva	24
1.5.2.2. Regulacija broja makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva	25
1.5.2.3. Osobitosti decidualnih makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva	27
1.5.2.4. Alternativno aktivirani makrofagi na spoju majčinih i fetalnih tkiva	29
1.5.2.5. Biološka uloga makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva	31
1.5.1.2.6. Makrofagi u patološkim trudnoćama	33

1.5.3. Stanice NK	36
1.5.3.1. Podrijetlo stanica NK u maternici	37
1.5.3.2. Decidualne stanice NK	38
1.5.3.3. Receptori decidualnih stanica NK	41
1.5.3.4. Uloga decidualnih stanica NK na spoju majčinih i fetalnih tkiva	43
1.6. Citotoksični mehanizmi na spoju majčinih i fetalnih tkiva	44
1.6.1. Perforin	45
1.6.2. Perforin na spoju majčinih i fetalnih tkiva	46
1.6.3. Fas Ligand	47
1.6.4. Fas/Fas Ligand na spoju majčinih i fetalnih tkiva	47
1.6.5. Nadziranje kratkoročnih citotoksičnih mehanizama na spoju majčinih i fetalnih tkiva	48
1.6.6. Uloga kratkoročnih citotoksičnih mehanizama na spoju majčinih i fetalnih tkiva	49
1.6.7. TRAIL na spoju majčinih i fetalnih tkiva	50
1.7. Kemokini	51
1.7.1. Izražaj kemokina na spoju majčinih i fetalnih tkiva	52
1.7.2. Kemokinski ligand 22 (CCL22) na spoju majčinih i fetalnih tkiva	54
1.7.3. Kemokinski ligand 3 (CCL3) na spoju majčinih i fetalnih tkiva	54
1.7.4. Kemokinski ligand 17 (CCL17) na spoju majčinih i fetalnih tkiva	55
1.8. Citokini na spoju majčinih i fetalnih tkiva	55
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	57

3. MATERIJALI I METODE	59
3.1. MATERIJALI	59
3.1.1. Kemikalije	59
3.1.2. Mediji i puferi	61
3.1.3. Laboratorijsko posuđe	62
3.1.4. Uređaji	64
3.1.5. Protutijela	65
3.1.6. Biološki material	70
3.2. METODE	71
3.2.1. Metoda imunohistologije	71
3.2.1.1. Uklapanje decidualnog tkiva u parafin	71
3.2.1.2. Uklanjanje parafina iz rezova decidualnog tkiva	71
3.2.1.3. Postupak otkrivanja antigena uz pomoć mikrovalne pećnice	72
3.2.1.4. Obilježavanje antigena	72
3.2.2. Dobivanje leukocitnih populacija iz decidue prvog tromjesečja trudnoće i periferne krvi trudnih žena	73
3.2.2.1. Dobivanje suspenzije leukocita iz decidualnog tkiva	73
3.2.2.2. Dobivanje suspenzije leukocita iz periferne krvi	74
3.2.2.3. Dobivanje adherentne i neadherentne frakcije decidualnih stanica	74
3.2.3. Istodobno određivanje površinskih i unutarstaničnih biljega metodom direktne i indirektne imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom	75

3.2.4. Test vezanja liganada za domenu za prepoznavanje ugljikohidrata na receptorima za endocitozu	76
3.2.5. Određivanje endocitoze pomoću FITC-dextrana	77
3.2.6. Magnetsko izdvajanje pojedinih staničnih subpopulacija	78
3.2.6.1. Pozitivno magnetsko odvajanje stanica NK	78
3.2.6.2. Uspostavljanje protokola za magnetsko pročišćavanje decidualnih makrofaga	79
3.2.7. Metoda ELISA	80
3.2.7.1 Priprema supernatanata pročišćenih decidualnih CD14 ⁺ stanica	80
3.2.7.2. Određivanje kemokina metodom ELISA	80
3.2.8. Testovi ko-kultivacije decidualnih CD56⁺ stanica i CD14⁺ stanica	81
3.2.8.1. Polarizacija stanica NK	81
3.2.8.2. Proliferacija stanica NK	81
3.2.8.3. PKH-26 (red) test citotoksičnosti	82
3.3. Statistička obrada podataka	83
4. REZULTATI	84
4.1. Fenotipska obilježja decidualnih CD14⁺ stanica u usporedbi s autolognim CD14⁺ stanicama periferne krvi	84
4.1.1. Izražaj CD1a i CD83 biljega na CD14 ⁺ stanicama decidue prvog tromjesečja trudnoće	84
4.1.2. Izražaj CD1a i CD83 biljega na CD14 ⁺ stanicama periferne krvi trudnih žena	86
4.1.3. Izražaj CC receptora (CCR) 5 i CCR 7 na CD14 ⁺ stanicama decidue prvog tromjesečja trudnoće i periferne krvi trudnih žena	86

4.1.4. Fenotipska svojstva decidualnih CD14 ⁺ stanica u odnosu na CD14 ⁺ stanice periferne krvi	89
4.2. Utvrđivanje prisustva CD14⁺/CD209⁺ u decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne trudnoće	91
4.2.1. Smještaj dvostruko pozitivnih CD14 ⁺ CD209 ⁺ stanice u decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne trudnoće	91
4.3. Fenotipska i funkcijska obilježja decidualnih CD14⁺ stanica prvog tromjesečja trudnoće nakon stimulacije lipopolisaharidom	93
4.3.1. Izražaj CD206 na decidualnim CD14 ⁺ stanice prvog tromjesečja trudnoće nakon stimulacije s lipopolisaharidom	93
4.3.2. Utjecaj lipolisaharida na endocitozu FITC-dextrana u decidualnim CD14 ⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće	94
4.3.3. Stvaranje IFN- γ u decidualnim CD14 ⁺ stanicama nakon stimulacije lipopolisaharidom	94
4.4. Stvaranje citokina i kemokina u decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja normalne trudnoće	97
4.4.1. Stvaranje IL-4 i IFN- γ u decidualnim CD14 ⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće	97
4.4.2. Stvaranje i lučenje kemokina u decidualnim CD14 ⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće	98
4.5. Prisustvo MUC1 na majčino-fetalnom spoju prvog tromjesečja normalne trudnoće	100
4.5.1. Izraženost MUC1 u decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne trudnoće	100
4.6. Utjecaj MUC1 na decidualne CD14⁺ stanice prvog tromjesečja normalne trudnoće	102

4.6.1. Vežanje i internalizacija MUC1 za domenu za prepoznavanje ugljikohidrata na CD206 i CD209 receptorima decidualnih CD14 ⁺ stanica prvog tromjesečja trudnoće	102
4.6.2. Utjecaj MUC1 na ulazak FITC dekstrana u decidualne CD14 ⁺ stanice prvog tromjesečja trudnoće	104
4.6.3. Fenotipska obilježja decidualnih CD14 ⁺ stanica stimuliranih s MUC1 in vitro	106
4.6.4. Utjecaj MUC1 na stvaranje citokina i kemokina u decidualnim CD14 ⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće	108
4.7. Uspostavljanje protokola za pročišćavanje decidualnih CD14⁺ stanica iz tkiva	110
4.8. Međudjelovanje decidualnih CD14⁺ stanica i autoloških decidualnih stanica NK	113
4.8.1. Utjecaj nestimuliranih i MUC1 stimuliranih decidualnih CD14 ⁺ stanica na stvaranje citokina u decidualnim CD56 ⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće „in vitro“	113
4.8.2. Utjecaj nestimuliranih i MUC1 stimuliranih decidualnih CD14 ⁺ stanica na stvaranje kemokina u decidualnim CD56 ⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće „in vitro“	114
4.8.3. Izražaj citotoksičnih medijatora u decidualnim CD56 ⁺ stanicama nakon kultivacije s CD14 ⁺ stanicama prethodno stimuliranih s MUC1	116
4.8.4. Proliferacija decidualnih CD56 ⁺ stanica nakon kultivacije s autološkim CD14 ⁺ stanicama	118
4.8.5. Izražaj aktivacijskih i inhibicijskih receptora na decidualnim stanicama NK	119
4.8.6. Citotoksičnost decidualnih stanica NK prema autološkim CD14 ⁺ stanicama	122

4.8.7. Utjecaj aktivacijskog receptora NKG2D i njegovih liganada MIC A/B na citotoksičnost decidualnih CD56 ⁺ stanica prema decidulnim CD14 ⁺ stanicama.	122
4.8.8. Utjecaj NRC, NKp30, NKp44 i NKp46 na citotoksičnost decidualnih CD56 ⁺ stanica prema decidulnim CD14 ⁺ stanicama	125
4.8.9. Citotoksičnost CD56 ⁺ stanica prema decidualnim CD14 ⁺ stanicama stimuliranih Lipopolisaharidom ili s MUC1	125
5. RASPRAVA	128
6. ZAKLJUČAK	153
7. LITERATURA (referencije)	157
ŽIVOTOPIS	195

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Spoj majčinih i fetalnih tkiva kao imunološki privilegirano mjesto

Trudnoća je jedinstveno stanje kada se zametak, imunološki i genetički različit od majke ("alogeni transplantat") razvija u imunološki kompetentnom majčinom organizmu. Zametak nasljeđuje 50% svojih gena od oca. Prema klasičnom pravilu transplantacijske imunologije ove bi antigene trebao prepoznati majčin imunološki sustav, što bi dovelo do pogubnog imunološkog odgovora. To se međutim u pravilu ne događa. Tijekom normalne trudnoće zametak se razvija 40 tjedana u imunološki neprijateljskom okolišu, stoga se nameće pitanje zašto majčin imunološki sustav ne odgovara na prisustvo stranih antigena na način koji bi doveo do odbacivanja ploda (1). Medawar (2) je 1953.g. uveo pojam „fetalni alograft“. U radu pod naslovom „Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates“ navodi da je semi-alogenični fetus sposoban preživjeti, jer je imunološko međudjelovanje između majke i fetusa potisnuto zbog smanjenog izražaja fetalnih antigena usljed anatomske zapreke ili potiskivanja funkcije majčinih limfocita. Čini se logičnim da je neprepoznavanje fetalnih antigena povoljno za ishod trudnoće. Međutim, postoje brojni dokazi da imunološki sustav prepoznaje trudnoću. Pronađena su protutijela usmjerena prema antigenima očeva podrijetla, prema fetalnim antigenima i antigenima posteljice (1). Brojne teorije su pokušale objasniti postojanje imunološki povlaštenog stanja u decidui, a različita razmišljanja se mogu svesti na tri osnovna mehanizama. Prva je teorija mehaničke prepreke koju u maternici čini trofoblast i decidua koji sprječavaju kretanje aktiviranih limfocita T na mjesto implantacije, a istovremeno odvaja zametak i sprječava odlazak fetalnih stanica u majčinu cirkulaciju. Međutim, brojna istraživanja su pokazala da ova prepreka nije tako troma i nepropusna kao što se nekad smatralo, budući da su pronađene stanice ploda u sve većem broju u majčinoj cirkulaciji kako trudnoća napreduje (1). Dokazano je i seljenje majčinih stanica u fetus (3). Potiskivanje

učinkovitosti majčinog imunološkog sustava tijekom trudnoće je sljedeći predloženi mehanizam. Brojne tvari kao što je progesteron, prisutne u perifernoj krvi trudnice, potiskuju imunološki sustav „in vitro“ i „in vivo“ (1). Progesteron potiskuje dijeljenje, umnožavanje i razvoj citotoksičnih limfocita T, (4, 5.) citotoksičnost i aktivaciju stanica NK (od engl. Natural killer), sintezu prostanglandina F, a potiče nastanak regulacijskih limfocita T koji potiskuju imunološki sustav (4, 5). Međutim, trudnoća se ne može promatrati kao stanje smanjene aktivnosti imunološkog sustava jer žene u lošim higijenskim uvjetima mogu uspješno iznijeti trudnoću do termina, a pokazano je i da imunološki odgovor trudne žene na virusne antigene tijekom trudnoće nije oštećen (2, 6). Novija istraživanja ukazuju da je majčina stečena imunost posredovana limfocitima T doista potisnuta, dok sustav prirođene imunosti (monociti/makrofagi, stanice NK) mora biti potaknut da bi implantacija bila uspješna (7). I treći mehanizam je smanjeni izražaj glavnih antigena tkivne podudarnosti, MHC (od engl. Major histocompatibility complex) ili HLA (od engl. Human leukocyte antigen) na trofoblastnim stanicama. Geni koji su odgovorni za prepoznavanje tuđih molekula u reakcijama odbacivanja su organizirani u tri regije koje kodiraju molekule HLA razreda I i II, dok su HLA molekule razreda III proteini komponenta komplekta. Molekule HLA razreda I izražene su na gotovo svim stanicama s jezgrama, dok HLA II molekule imaju ograničenu raspodjelu i nalaze se samo na antigen predodnim stanicama. Za molekule HLA razreda I postoji šest HLA lokusa, tri klasična (HLA-A, -B, -C) i tri neklasična (HLA-E, -F, -G). Za razliku od svih ostalih humanih stanica, stanice trofoblasta, izuzev HLA-C molekule, ne izražavaju klasične HLA molekule razreda I niti razreda II na svojim membranama te time vjerojatno najznačajnije doprinose uspješnoj implantaciji (8). S obzirom na izraženost molekula HLA I razlikuju se najmanje dvije vrste trofoblastnih stanica: a) vilozni sinciotrofoblast koji ne izražava molekule HLA razreda I i b) izvanresičasti trofoblast koji napušta resice i prodire u deciduu koji izražava molekule HLA razreda I. Stanice izvanresičastog trofoblasta izražavaju neklasične HLA-G, HLA-E i HLA-F

molekule razreda I te klasične, nisko polimorfne, HLA-C molekule. (9, 10). Majčine imunološke stanice dolaze u neposredan dodir s viloznim citotrofoblastom koji je imunološki neutralan, ali lokalno mogu biti stimulirane s HLA I pozitivnim stanicama izvanresičastog trofoblasta koji se seli u deciduu (11). Navedene molekule omogućuju preživljavanje stanica trofoblasta u izravnom dodiru s imunokompetentnim decidualnim stanicama, u prvom redu stanicama NK koje na svojim membranama izražavaju receptore koji prenose inhibicijske, odnosno aktivacijske signale u stanicu (12). Molekula HLA-G ne može potaknuti pro-upalni odgovor posredovan majčinim limfocitima T (13). Razlikuju se četiri membranske te tri topljiva oblika HLA-G molekule. Membranska forma potiskuje aktivnost CD4+ limfocita T dok topljive molekule potiskuju djelovanje CD8+ citotoksičnih limfocita T tako da ih uvede u neprogramiranu staničnu smrt Fas/Fas Ligand mehanizmom (14). Stanice NK i makrofagi također izražavaju receptore za HLA-G molekule (ILT2, od engl. Immunoglobuline-like transcripts), a međusobno prepoznavanje tih molekula pokreće lučenje citokina važnih za implantaciju i angiogenezu (14). Molekulu HLA-C kao i njene receptore na stanicama NK, KIR (od engl. killer-immunoglobuline like receptor) karakterizira visok polimorfizam te ovisno o kombinaciji HLA-C i KIR molekula koje izražavaju stanice trofoblasta i majčine stanice NK, ovisi hoće li doći do kočenja ili poticanja citotoksičnosti i aktivacije stanica NK s mogućim posljedicama za ishod trudnoće (15).

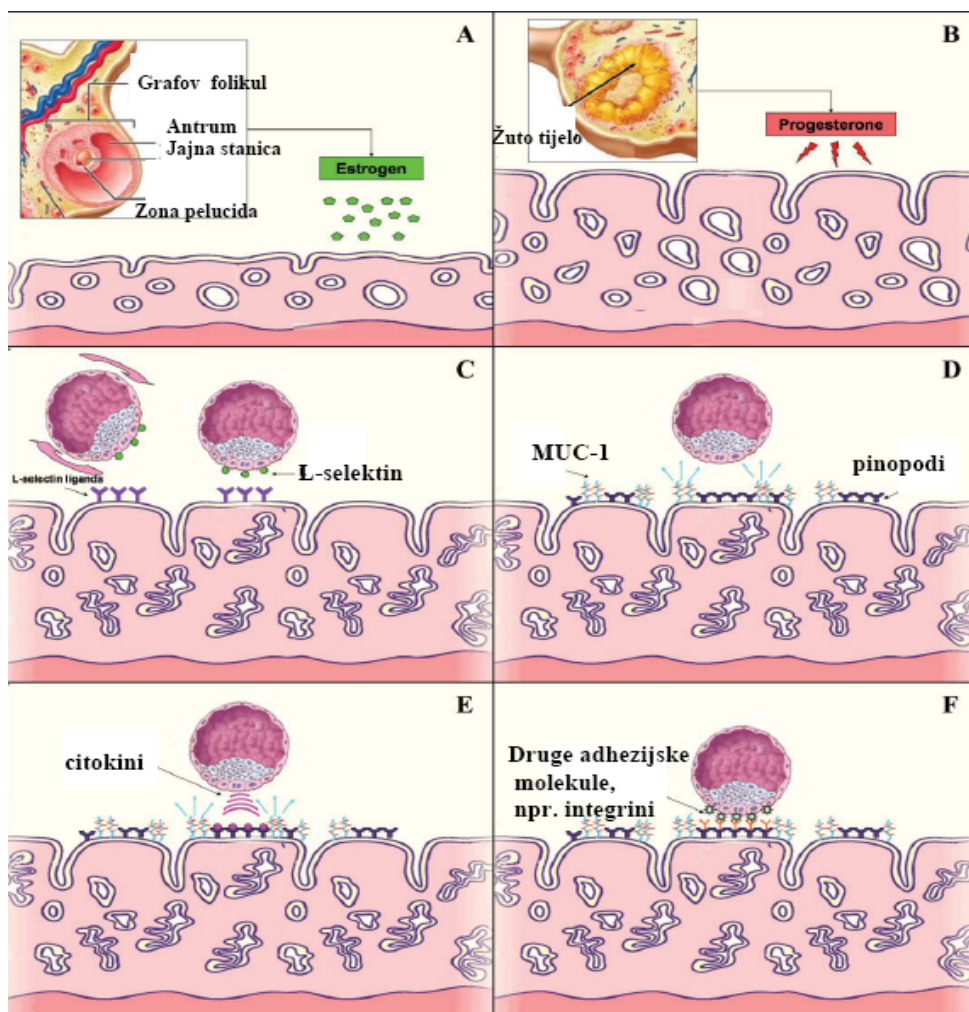
1.2. Decidualizacija i implantacija

U maternici, na mjestu gdje majčino i fetalno tkivo dolaze u izravan odnos zbiva se niz promjena neophodnih za uspješnu implantaciju blastociste. Kako bi moglo doći do implantacije, endometrij se mora preoblikovati u deciduu. Decidualizacija se sastoji od niza promjena koje zahvaćaju endometrijalne stromalne stanice, žlijezde i krvne žile kao i imunološke stanice. Kod ljudi je neovisna o prisustvu blastociste i počinje u kasnoj sekrecijskoj fazi endometrijskog ciklusa, kada dolazi do zadebljanja

sluznice maternice, a žlijezde koje postaju izvijugane počinju u lumen maternice izlučivati glikoproteine i lipide potaknute progesteronom i sličnim čimbenicima koji su sposobni podići razinu cikličnog AMP-a (cAMP) (16, 17). Decidualizacija se nastavlja kroz trudnoću te nadzire postupno prodiranje trofoblasta i nastanak posteljice promjenom izražaja regulacijskih čimbenika kao što su metaloproteinaze, citokini, površinski integrini i molekule HLA. Trofoblast s druge strane šalje parakrine (18) signale koji podešavaju izražavanje gena u decidualnim stromalnim stanicama koje postaju okrugle i pokazuju strukturu sličnu miofibroblastima i epitelnim stanicama (19), a oslobađaju nekoliko faktora kao što je prolaktin, relaksin, renin i specifične bjelančevine izvanstaničnog matriksa kao što su laminin i fibronektin (20). Dolazi do produžavanja krvnih žila istovremenim umnožavanjem endotelnih i glatkih mišićnih stanica uz očuvanje cjelovitosti strukture krvnih žila.

Implantacija predstavlja kritični korak u razmnožavanju mnogih vrsta. To je jedinstveni biološki događaj u kojem blastocista dolazi u bliski dodir sa stanicama endometrija kako bi nastala posteljica koja će omogućiti vezu između rastućeg zametka i majčine cirkulacije (21). Za implantacije je potreban prijemljiv ili „receptivni“ endometrij, normalni funkcionalni embrio u stadiju blastociste i vremenski i prostorno usklađen dijalog između majčinog tkiva i zametka (22). Odvijanje implantacije dijeli se u tri razine: apozicija (priljubljivanje), adhezija (pričvrščivanje) i invazija (prodiranje). Tijekom apozicije trofoblastne stanice se priljubljuju za receptivni endometrijski epitel. Blastocista će se zatim postupno usidriti za bazalnu laminu stanica endometrija i stromalnu izvanstaničnu tvar te se nakon toga povezanost između embrija i endometrija ne može prekinuti, a blastocista nastavlja prodirati kroz luminalni epitel (23). Implantacija je moguća u usko ograničenom vremenskom razdoblju koje se naziva „peri-implantacijski prozor“ (24) te traje od 20-24 dana endometrijskog ciklusa (25), a ovisan je u početku o prisustvu estrogena i progesterona iako su daljnje morfološke i biokemijske promjene uvjetovane signalima koji potiču od blastociste i prodirućeg trofoblasta (26). Izvan

ovog razdoblja površina epitela je prekrivena debelim slojem glikokaliksa koji se većinom sastoji od mucina, posebice Mucina I (MUCI), transmembranskog glikoproteina koji svojom strukturom sprječava prijanjanje blastociste (27). Implantacija blastociste također je otežana velikim brojem dezmosoma koji se nalaze na lateralnim stranama epitelnih stanica. Kod miša i štakora peri-implantacijsko razdoblje karakterizirano je smanjenjem izražaja mucina. U ljudi dolazi do gubitka mucina na mjestu implantacije blastociste djelovanjem proteaza koje su aktivirane čimbenicima koje luči blastocista (27). Prijanjanje blastociste ovisi o međudjelovanju s adhezijskim molekulama kao što su selektini, integrini i trofinini (28) izraženi na trofoblastu i epitelnim stanicama maternice. Prodiranje blastociste potaknuto je smanjenjem gustoće dezmosoma i enzimatskom razgradnjom membrane što dovodi do implantacije u deciduu (29). Ključnu ulogu u nadzoru implantacije imaju endometrijski kemokini i citokini koji su odgovorni za privlačenje leukocita u deciduu gdje dovode do blagog pro-upalnog stanja koje potječe iz više izvora. Za decidualizaciju je svojstveno međudjelovanje stanica NK s ne-klasičnim molekulama HLA razreda I koje su izražene na trofoblastu (30). U ranoj fazi implantacije imunološki odgovor je posredovan citokinima čiji poremećaj može poticati upalni odgovor koji kasnije može dovesti do različitih poremećaja trudnoće (31). Složeni proces implantacije kod ljudi prikazan je na Slici 1.

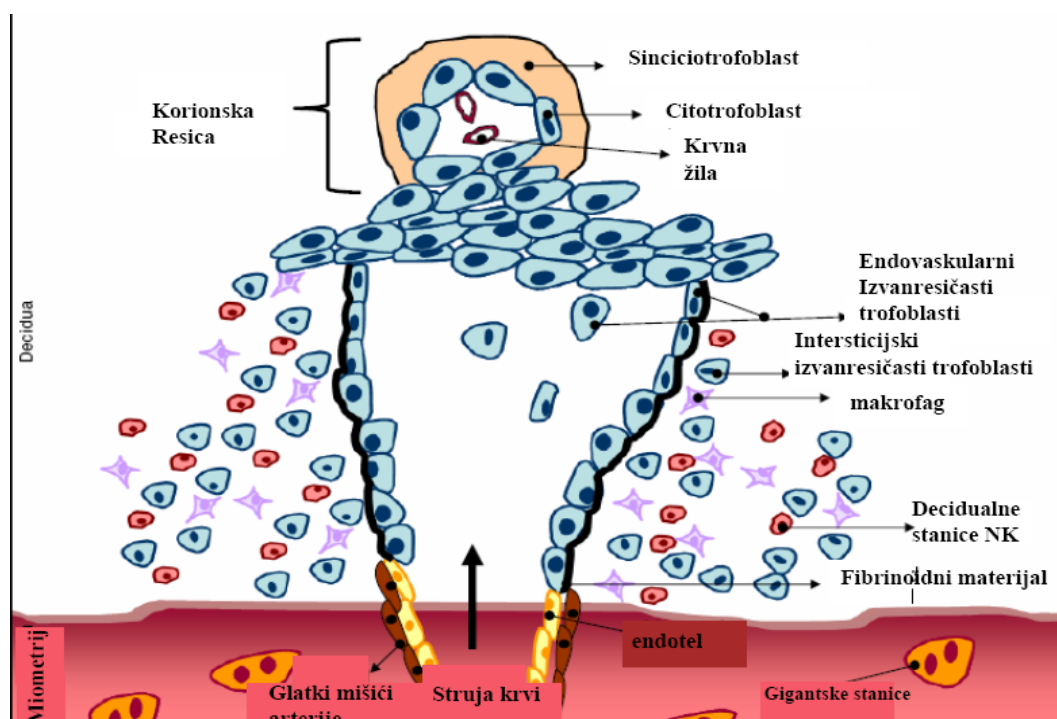


Slika 1. Implantacija blastociste u maternici. Endometrij u odgovoru na estrogene proliferira (A), progesteron iz žutog tijela uzrokuje diferencijaciju endometrija (B), nakon što blastocista uđe u maternicu i slobodno se kotrlja pod utjecajem L-selektina (C), a MUC1 odbija blastocistu i sprječava njeno prijanjanje na mjesta nepogodna za implantaciju (D). Kemokini i citokini privlače blastocistu na mjesto najpogodnije za implantaciju (E), a adhezijske molekule čvrsto priljubljuju blastocistu uz endometrij i omogućuju uspješnu implantaciju (F). Prilagođeno iz Achache H, Human Reproduction 2006; 6(12):731-746

1.3. Pregradnja spiralnih arterija

Zametak se u ranim fazama razvoja dijeli u dvije grupe stanica. Unutarnji sloj od kojeg se razvija sam embrio i vanjski, embrijski trofoblast, iz kojeg se razvijaju trofoblastne stanice. Citotrofoblast je zametni sloj trofoblasta iz kojeg zatim nastaje sinciotrofoblast i izvanresičasti trofoblast (32). Tijekom implantacije blastociste, stanice citotrofoblasta se spajaju kako bi činile vanjski sloj stanica s brojnim jezgrama koje se ne dijele. Sinciotrofoblast raste zahvaljujući citotrofoblastnim stanicama. Dijeljenje jezgri i sinteza DNA se ne događa u stanicama sinciotrofoblasta, iako je sinteza bjelančevina prisutna te se homeostaza sinciotrofoblasta održava spajanjem citotrofoblastnih stanica i odbacivanjem apoptotičkih sincicijalnih tjelešaca koji uklanjaju stare kondenzirane jezgre (32, 33). Oko 14 dana nakon implantacije citotrofoblast prodire kroz sloj sinciotrofoblasta i omogućuje razvoj izvanresičastog trofoblasta koji prodire u endometriju. Izvanresičasti trofoblast sačinjava intersticijski izvanresičasti trofoblast koji ulazi u stromu i endovaskularni izvanresičasti trofoblast koji se seli kroz lumen spiralnih arterija do unutrašnje trećine miometrija. Smatra se da je pregradnja spiralnih arterija posljedica zajedničkog djelovanja ovih dviju podvrsta (34). Tijekom rane trudnoće humane spiralne arterije podliježu postupnim, ali izrazitim promjenama i to prije kolonizacije trofoblastom, pri čemu endotelne stanice postaju bazofilne i vakuolizirane te dolazi do hipertrofije glatkog sloja muskulature. Međutim, potpuna vaskularna pretvorba zamjećuje se samo u prisustvu trofoblasta, udružena je s gubitkom vaskularnih stanica, a izvanstanični fibrinoidni talozi zamjenjuju normalna elastična i kolagena vlakna izvanstaničnog matriksa (35). Razgradnja unutarnje elastične lamine i elastične medije arterija miometrija omogućuje nastanak krvnih žila koje su proširene, visokog protoka krvi i niskog otpora kojima nedostaje vazomotorna kontrola (33, 36). Značajnu ulogu u pregradnji spiralnih arterija imaju decidualni leukociti. Stanice CD56⁺ NK i CD68⁺ makrofagi su odsutni oko spiralnih arterija koje nisu preinačene, prisutni su u značajnom broju u arterijama koje

podliježu aktivnoj pregradnji, ali su ponovno odsutni u spiralnim arterijama koje su u potpunosti pregrađene (36, 37). Budući da decidualne stanice NK i makrofagi stvaraju različite proteaze kao što je matriks-metaloproteinaza-7 (MMP-7) i MMP-9 (38) razumljivo je da je leukocitima posredovan katabolizam vaskularnog izvanstaničnog matriksa odgovoran za gubitak povezanosti između glatkih mišićnih stanica. Ovakve promjene udružene s gubitkom prijanjanja stanica i izvanstaničnog matriksa čini arterije podložne kolonizaciji izvanresičastim trofoblastom i olakšava njegovu invaziju (36). Pregradnja spiralnih arterija je posredovana poticanjem apoptoze stanica spiralnih arterija što je posredovano apoptotičkim medijatorima, FasL ili TRAIL (od engl. Tumor necrosis (TNF)-related apoptosis-inducing ligand) koji su izraženi na trofoblastnim stanicama. Izmjene u njihovom lokalnom izražaju kao i unutarstanična koncentracija pro- i protu- apoptotičkih signalnih molekula može dovesti do veće podložnosti apoptozi pojedinih stanica u odnosu na druge i na taj način doprinositi nadziranju stanične smrti u vremenu i prostoru. Preinaka krvnih žila je ovisna o prisustvu leukocita, prodiranju izvanresičastog trofoblasta i izraženosti pro- i protu-apoptotičkih molekula i proteaza te podložnosti spiralnih arterija pregradnji (36) kao što prikazuje Slika 2.



Slika 2. Pregradnja spiralnih arterija. Prilagođeni iz Lunghi L, Reproductive Biology and Endocrinology 2007; 5:6

Strogo nadziran i postupni gubitak stanica krvnih žila i katabolizam izvanstaničnog matriksa potreban je kako bi se postigla ravnoteža između vazodilatacije i očuvanja cjelovitosti krvnih žila. Pregradnja spiralnih arterija predstavlja usklađen proces koji se zbiva u prвих dvadeset tjedana trudnoće gdje raznovrsni izražaj adhezijskih molekula, sastavnica izvanstaničnog matriksa, proteaza i čimbenika koji omogućuju stanicama preživljenje, dovodi do razlika u fenotipu stanica i njihovoj sklonosti prema staničnoj smrti (36). Ovo dovodi do stvaranje sredine specifične za decidualizirano tkivo koje omogućava prodiranje trofoblasta i nameće prostorna i vremenska ograničenja u pregradnji spiralnih arterija (36).

1.4. Mucini

Značenje riječi mucin mjenjalo se zadnjih desetljeća zahvaljujući prije svega velikom napretku u glikobiologiji. Tijekom 1970. znanstvenici su mucine označili kao glavne glikoproteine u sluzi koji oblažu površinu glandularnih epitelnih stanica (39).

Najistraženiji su bili oni izolirani iz žlijezda slinovnica krava i ovaca i služili su kao strukturni model za ovu vrstu glikoproteina budući da imaju svojstva koja su se tada smatrala tipičnim za mucine, visoki postotak ugljikohidrata (više od 50%) i peptidna jezgra koja je bogata treoninom i serinom te služi kao osnova za vezanje oligosaharida (39). Tijekom 1980. dolazi do promjene u razumjevanju strukture, a time i funkcije mucina. Kasnije su pronađeni tumorski epitopi na mucinima što je dovelo do istraživanja mucina u području tumorske imunologije (40). Godine 1990. pronađen je gen na DNA koji je odgovoran za sintezu mucina (39).

Mucini su obitelj visoko glikoziliranih molekula velike molekularne mase (250-500 kDa). Sastoje se od neglobularne proteinske osnove koja sadrži visoko glikozilirane i neglikozilirane domene. Većina karbohidratnih domena vezane su O-glikozidnom vezom između N-acetil-galaktozamina i pobočnih lanaca serina ili treonina iako su neki oligosaharidi vezani vezom između dušika iz asparagina i N-acetilglukozamina (41). Jezgra mucina sadrži velike količine serinskih, treoninskih, alaninskih, glicinskih i prolinskih ostataka što čini ove molekule izrazito razgranatim (41). Izolirana je DNA iz preko 20 epitelnih mukoznih gena, a svrstani su u jednu od dvije kategorije: mucini vezani na staničnu površinu i sekrecijski mucini. Mucin2, MUC5AC, MUC5B, MUC 6-8, MUC18 (42) pripadaju u sekrecijske mucine i vezani su disulfidnim vezama tako da čine velike oligomere. Visoko O-glikozilirane i hidratizirane domene leže između disulfidnih čvorova tako da mucini u sluzi služe kao lubrikanti i štite epitelne stanice (43). U grupi mucina koji su vezani na staničnoj površini ubrajaju se MUC1 koji je još poznat pod imenima episijalin, polimorfni epitelni mucin, MUC3A, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 i MUC20 (42).

Mucini koji su izraženi na površini stanice mogli bi djelovati kao prepreka između stanične površine i vanjskog okoliša štiteći na taj način stanice od mikroorganizama, toksina ili proteolitičkih faktora (39). Prisutni su na površini različitih epitelnih

stanica i žljezdanog tkiva. Tkiva koja ne izražavaju mucine su epitel kože i mezenhimalna tkiva (39).

Unutar epitelnih stanica kanalića mucini su smješteni na apikalnoj površini okrenutoj šupljini kanalića gdje su odgovorni za podmazivanje epitelnih površina, sprječavaju dehidraciju, osiguravaju zaštitu od enzimatske razgradnje. Imaju ulogu u hvatanju staničnog detritusa, a smatra se i da imaju moguću zaštitnu funkciju u ljudskom mlijeku koju ostvaruju specifičnim vezanjem unesenih bakterijskih i virusnih patogena. Prisustvo bakterija često je na mukoznim membranama, a mucini štite stanice onemogućavajući pristup stanicama svojom steričkom strukturom. Bakterijski adhezini vežu se na mucine na staničnoj površini te na taj način priječe infekciju (39).

1.4.1. Mucin1

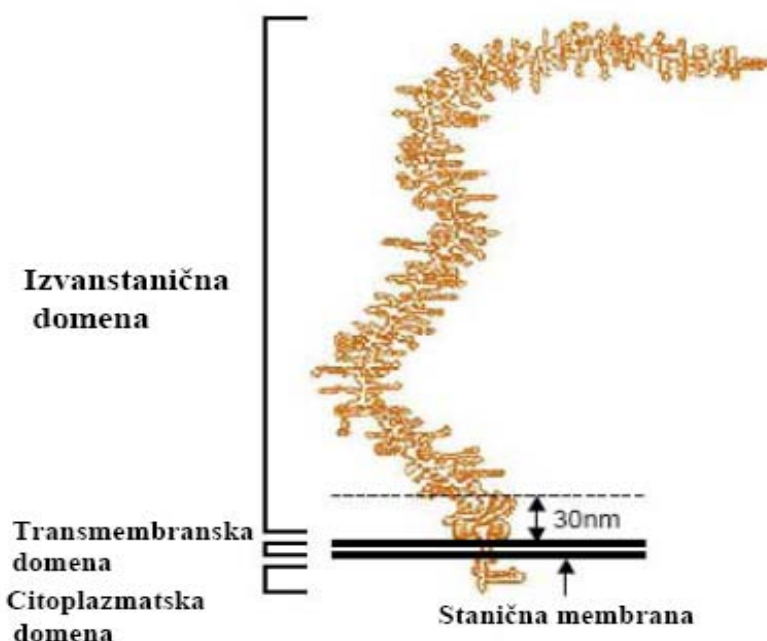
Gen za MUC1 nalazi se na dugom kraku 1. kromosoma, sastoji se od 7 egzona i varira u veličini od 4 do 7 kb, ovisno o broju ponavljajućih sekvenci u 2. egzonu (44). Mucin1 ima karakteristike membranske bjelančevine koja se sastoji od tri domene: kratka citoplazmatska domena, transmembranska domena koja je visoko konzervirana među vrstama i velika izvanstanična domena. Izvanstanična domena sadrži 20-25 uzastopno ponavljajućih sekvenci koje se sastoje od 30 aminokiselina bogatih serinskim, treoninskim i prolinskim ostacima što omogućava izrazitu O-glikozilaciju. Jezgra proteina ima težinu 120-225 kDa, a glikozilirana teži od 250-500 kDa (45). Mucin1 se stvara na zrnatoj endoplazmatskoj mrežici, prelazi preko glatke endoplazmatske mrežice i dolazi na Golgiev aparat gdje prolazi proces glikozilacije te se potom prenosi na staničnu površinu (46). Kod miša MUC1 se prevodi u bjelančevinu, glikozilira i prenosi na staničnu površinu unutar 142 minute. Tijekom ovog procesa proteolitički se odvoji na mjestu između transmembranske domene i uzastopno ponavljajuće domene. Nakon što dođe do stanične površine MUC1 se ponovno iskoristi kroz Golgiev aparat ili podliježe endocitozi nakon koje slijedi

razgradnja vjerojatno u lizosomima. Ravnoteža u prometu MUC1 na staničnoj površini vjerojatno je posljedica njegovog oslobađanja ili odvajanja. Dio mucina (30-50%) koje luče epitelne stanice u maternici oslobađaju se s apikalne površine stanice u apikalni medij ili lumen žlijezda, a ostatak se razgradi unutar stanice endocitozom (46). Mucin1 (MUC1) koji ima citoplazmatski rep povezan je i s unutarstaničnim signaliranjem jer ima mjesta koja se potencijalno mogu fosforilirati i vezati SH2 domenu, a ovo prenošenje signala u stanicu moglo bi biti značajno za stanično prijanjanje (47). Ulogu MUC1 u napredovanju tumora i metastaziranju treba posebno istaknuti. Mucin1 je izražen na bazolateralnoj površini malignih stanica koje gube polarizaciju. MUC1 i MUC4 mijenjaju međudjelovanje između stanica i stanica i izvanstaničnog matriksa čineći steričku prepreku. Smatra se da povećana izraženost MUC1 na stanicama čini početni korak u nastanku metastaza, jer se sprječava međustanični dodir posredovan E-katherinima ili dodir stanice i matriksa posredovan integrinima. Ova aktivnost MUC1 i MUC4 ovisna je o broju uzastopnih ponavljanja aminokiselina u ektodomeni jer smanjenje njihovog broja čini ove molekule neučinkovitim u međudjelovanju stanica te stanica i izvanstaničnog matriksa (48). Mucin1 sudjeluje i u bijegu tumorskih stanica imunološom sustavu budući da su tumorske stanice koje izražavaju MUC1 otporne na ubijanje posredovano stanicama NK i citotoksičnim limfocitima T, a dovode i do lokalne anergije limfocita T i potiskivanja umnažanja, što se poništava u prisustvu IL-2 (49). Budući da se MUC1 luči s površine tumorskih stanica, može se otkriti u serumu bolesnika oboljelih od karcinoma te predstavlja poznati tumorski biljeg (Ca-15.3).

1.4.2 MUC 1 u ženskom reproduktivnom sustavu

U endometriju, MUC1 se proteže preko glikokaliksa i vjerojatno predstavlja prvu molekulu na koju zametak nailazi na svom putu prema prijanjanju za endometrij (50). Mucin1 se izdiže iznad stanične membrane 200-500 nm dok se većina ostalih

bjelančevina zadržava u blizini granice glikokaliksa koji je debljine oko 10 nm kao što pokazuje Slika 3.



Slika 3. Prikaz veličine i strukture MUC1 u odnosu na staničnu membranu Vodoravne linije označavaju udaljenost do koje se većina staničnih bjelančevina proteže u izvanstanični prostor. S lijeve strane su označene glavne tri domene od kojih se sastoji MUC1. Prilagođeno iz Brayman M. Reprod Biol Endocrin 2004; 2:4–12.

Smatra se da velika koncentracija MUC1 na staničnoj površini sprječava staničnu adheziju zaklanjajući površinske adhezijske molekule i sprječava dodir s glikoproteinima na suprotnoj staničnoj membrani te na taj način smanjuje stanično međudjelovanje kao i integrinima posredovanu izvanstanično prijanjanje (51). Mnoštvo salicilatnih kiselih ostataka doprinosi anti-adhezijskim svojstvima MUC1 budući da ovi ostatci čine molekulu nezgrapnom i time doprinose njenoj krutosti. Nadalje, brojni salicilatni i sulfatni ostaci daju molekuli glikana negativan naboj što doprinosi anti-adhezijskom učinku budući da su stanice trofoektoderma također negativno nabijene (51). Tako MUC1 stvara barijeru u maternici i onemogućava dodir

embrija i majčinih apikalnih epitelnih stanica (52). Pretpostavlja se da MUC1 odbija blastocistu dok ne dođe pravo vrijeme i mjesto za implantaciju (29). U miša tijekom proestrusa, estrusa i metaestrusa, MUC1 je izražen na površini luminalnih i glandularnih epitelnih stanica. Međutim, tijekom diestrusa prisutan je na površini glandularnih epitelnih stanica dok je smanjen njegov izražaj na površini luminalnih stanica, a najjače je izražen na njihovoj apikalnoj površini. Tijekom rane trudnoće MUC1 je izražen na površini i luminalnih i glandularnih epitelnih stanica, a smanjuje se 3. dana trudnoće na luminalnim epitelnim stanicama, dok 4. dana u potpunosti nestaje s površine epitelnih stanica te tako ostaje sve do 6. dana trudnoće (53). Tijekom estrusa razina uterine mRNA za MUC1 je visoka i ostaje takva do 4 dana trudnoće kada relativna količina mRNA drastično pada. Izraženost MUC1 je smanjena prije implantacije u prijemljivom endometriju miša i svinje (29). Visoke razine progesterona smanjuju izraženost MUC1 i na taj način olakšavaju dodir između embrija i endometrija otkrivajući molekule CAM (od. engl Cell adhesion molecules) na epitelnoj površini. Stoga, MUC1 potiskuje implantaciju, a smanjenje njegove izraženosti doprinosi prijemljivosti endometrija (29). U ljudi je povećana izraženost MUC1 u endometriju tijekom peri-implantacijskog razdoblja (41). Povećava se razina mRNA za MUC1 kao i samog proteina od proliferacijske prema sredini sekrecijske faze (54) što je paradoksalno, jer bi bilo za očekivati da se izraženost inhibicijskih čimbenika smanjuje tijekom implantacije. Iako progesteron u ranoj trudnoći povećava stvaranje i lučenje MUC1 na sistemske razine, čini se da lokalni mehanizmi, vjerojatno posredovani parakrinim signalima, uklanjaju MUC1 i omogućavaju implantaciju blastociste koja je sposobna stvarati odgovarajući poticaj za implantaciju (55). Budući da manje vrijedni embriji nisu sposobni odaslati ovakav parakrini signal, onemogućena im je implantacija, iako ovo naravno nije u potpunosti učinkovit mehanizam u uklanjanju kromosomski malformiranih embrija (56).

1.4.3. Nadziranje izraženosti Mucina-1 u reproduktivnom sustavu

Dramatične promjene u izraženosti MUC1 tijekom estrusa u miša upućuje na to da u nadziranju izražavanja sudjeluju hormoni (41). U svinja i zečeva biosinteza i izraženost MUC1 u maternici povećava se pod utjecajem progesterona „in vitro“ i „in vivo“ dok estrogeni imaju neznatan učinak na izraženost MUC1. Razgradnja MUC1 tijekom prijelaza endometrija u receptivno stanje također je povećana. Poluživot MUC1 je dovoljno kratak da dovede do njegovog gubitka s epitelne površine ukoliko se sinteza zaustavi. Sukladno tome, koncentracija mRNA pada 10-20 puta tijekom peri-implantacijskog razdoblja, što se pripisuje učinku steroidnih hormona. Kod miša estrogeni potiču izraženost MUC1, a progesteron ima suprotan učinak. Djelovanje progesterona i estrogena posredovano je nuklearnim steroidnim hormonskim receptorima. Anti-estrogeni (ICI 164, 386) blokiraju učinak estrogena na izraženost MUC1, dok primjena anti-progestina RU486 uspostavlja ponovno izraženost MUC1 tijekom peri-implantacijskog razdoblja, ali i sprječava implantaciju (41).

1.4.4. Uklanjanje Mucina1 tijekom peri-implantacijskog razdoblja

Kako se MUC1 uklanja s površine stanica nije poznato, iako je pokazano da su ADAM17 i matriks metaloproteinaze (MMP-14, MT-MMP1) sposobne osloboditi MUC1 s površine stanica (27, 57). Prvotno vezanje blastociste za glikokaliks dovodi do oslobađanja mucina s lateralne površine što dovodi do međudjelovanja trofoblasta s adhezijskim sustavom epitelnih stanica. Time glikokaliks služi kao supstrat za prijanjanje i kao barijera implantaciji. Humane blastociste ko-kultivirane do stadija blastociste na jednosloju epitelnih stanica endometrija i potom prenešene na trodimenzijski sustav koji se sastoji od epitelnih stanica endometrija i izvanstaničnog matriksa vežu se za epitel, a MUC1 je odsutan s epitelnih stanica ispod i u bliskoj okolini embrija, dok je prisutan na većoj udaljenosti od mjesta implantacije (27). Čimbenici koji su izraženi na površini stanica blastociste ili ih blastocista luči dovode do lokalnog gubitka MUC1. Jedan od načina koji dovode do gubitka MUC1 i njegove

protu-adhezijske funkcije je uklanjanje njegovog izvanstaničnog dijela. Grupa bjelancevina koje se nazivaju „sheddas“ je sposobna za proteolizu izvanstaničnog dijela MUC1 (27). Citokin, TNF- α mogao bi igrati ulogu u lokalnom uklanjanju MUC1. Povećava genski izražaj MUC1 što je vjerojatno posredovano vezanjem NF κ B na njegovo vezno mjesto na promotoru za MUC1 te dovodi do uklanjanja MUC1 na humanim epitelnim stanicama maternice povećanjem izraženosti TACE/ADAM17 (27, 57). Nadalje, MT1-MMP također doprinosi uklanjanju izvanstaničnog dijela MUC1, a njegova izraženost se povećava tijekom razdoblja prijemljivosti u biopsijama endometrija. Imunohistokemija je pokazala bliski smještaj MUC1 i MT1-MMP u humanom epitelu maternice tijekom implantacije. Budući da na izraženost MT1-MMP ne utječe TNF- α , drugi čimbenici vjerojatno igraju ulogu u stabilnosti MUC1 (27).

1.4.5. Imunološka uloga Mucina-1 na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Mucin1 utječe na predočavanje antigena i potiče protu-upalni i snošljivi imunološki odgovor kod brojnih tumora. Decidualne antigen predočne stanice u bliskom su dodiru s endometrijskim žlijezdama, (58) posebice s njihovim bazalnim dijelom. Antigen predočne stanice na svojoj površini izražavaju CD209 (DC-specific ICAM non-integrin) (59, 60, 61.) i endocitni manozni receptor uključen u tiho uklanjanje upalnih molekula, (62) u započinjanje imunološkog odgovora endocitozom posredovanom kadherinom (63), te u poticanje protu-upalnog odgovora u dendritičkim stanicama podrijetlom iz monocita i makrofaga (60). Ovi receptori pripadaju C-tipu lektinskih receptora koji vežu molekule glikanske strukture kao što su karcinoembrijski antigen, MUC1 i TAG-72 (od engl. Tumor associated glycoprotein) pomoću svoje karbohidratne domene. Mucin1 je izražen na apikalnoj površini žlijezdanih i luminalnih epitelnih stanica, dok se TAG-72 luči tijekom normalnog endometrijskog ciklusa, najjače na epitelnim stanicama tijekom sekrecijske faze, (64), ali se ne nalazi u stromi ili na žlijezdanim stanicama tijekom

prvog tromjesečja trudnoće dok je prisutan na epitelnim stanicama tubarne trudnoće u blizini i na udaljenosti od mjesta implantacije (65). Smještaj antigen predočnih stanica uz žlijezde i izražavanje liganada za glikoproteine na njihovoj površini moglo bi omogućiti da mucin utječe na funkcije ovih stanica. Kada je karbohidratna domena manozog receptora na dendritičkim stanicama primjereno potaknuta, dovodi do sazrijevanja dendritičkih stanica alternativnim putem (58). Mijeloidne dendritičke stanice stvorene in vitro iz monocita sposobne su smanjiti upalnu reakciju i dovesti do stvaranja anergičnih ili regulacijskih T stanica nakon stimulacije domene za prepoznavanje ugljikohidrata specifičnim protutijelima (66) u prisutnosti glikoproteina. Dendritične stanice takvih svojstava specifične su za deciduu rane trudnoće i nužne za održavanje trudnoće, ali nisu svojstvene za razdoblje implantacije koje je udruženo s blagim pro-upanim odgovorom (67). Pokazano je da se TAG-72 veže za decidualne CD14⁺ stanice (60) i dendritičke stanice (65) pomoću karbohidratne domene manoznog receptora i to na način ovisan o dozi. Glikoprotein TAG-72 smanjuje unutarstanično stvaranje IL-15 i IFN- γ u decidualnim CD1a⁺ dendritičkim stanicama nakon 18 sati in vitro stimulacije (65). Interleukin-15 je najznačajniji čimbenik umnažanja, diferencijacije i sazrijevanja stanica NK periferne krvi (68). U decidui je intenzivno izražen u stromalnim stanicama, žlijezdanom epitelu, makrofagima i glatkim mišićnim stanicama (69) te utječe na proliferaciju decidualnih stanica NK (38) i potiče stvaranje perforina, FasL i granzima B na razini mRNA i bjelančevina (70). Smanjeno lučenje IL-15, utvrđeno u jajovodu na mjestu implantacije i mjestu udaljenom od implantacije kod tubarnih trudnoća doprinosi nalazu vrlo malog broja stanica NK s niskim citolitičkim potencijalom neučinkovitim u nadziranju rasta trofoblastnih stanica (71.) Stoga trofoblastne stanice dublje prodiru u stijenku maternice ugrožavajući ishod trudnoće. Mucinima sličan TAG-72 vezanjem na karbohidratnu domenu manoznog receptora na antigen predočnim stanicama dovodi do smanjenog lučenja IL-15. Ovo bi mogao biti barem jedan od razloga zbog kojih MUC1 mora biti uklonjen s mjesta implantacije kada je blaga pro -upalna

reakcija pogodna za porast broja stanica NK koje imaju veći citolitički potencijal te stoga mogu bolje nadzirati prodiranje trofoblasta (72).

1.4.6. Uloga Mucina-1 u patološkim trudnoćama

Žene s rekurentnim spontanim pobačajima imaju reducirani izražaj MUC1 u usporedbi s zdravom skupinom. Imunohistokemijsko obilježavanje pokazalo je da žene s ponavljajućim spontanim pobačajima tijekom sredine sekrecijske faze imaju smanjenu razinu MUC1 i glikana. Učinak MUC1 mogao bi biti važan u vođenju blastociste na pravo mjesto za implantaciju. Gen za MUC1 je polimorfan što je važno za normalnu implantaciju (74). Tako je analiza polimorfizma MUC1 gena kod plodnih u usporedbi s ženama s ponavljajućim neuspjesima implantacije pokazala visoku učestalost malih recesivnih alela MUC1 u žena smanjene plodnosti (74).

1.5. Leukociti na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Leukociti su važna sastavnica strome endometrija (38). Iako su stromalni leukociti prisutni u proliferacijskoj i ranoj sekrecijskoj fazi endometrijskog ciklusa, njihov broj se znatno povećava tijekom sredine sekrecijske faze, u vrijeme kad se očekuje implantacija, te nastavlja rasti tijekom rane trudnoće (75). Tijekom prvog tromjesečja trudnoće oko 30-40% stromalnih stanica su leukociti. Prisutne su tri glavne leukocitne vrste: zrnati limfociti nazvani stanicama NK, makrofagi i limfociti T (75). Drugi, manje zastupljeni, ali funkcionalno važni leukociti su dendritične stanice (76), prirodno ubilački limfociti T ili NKT (od engl. Natural killer T cells) (77) i regulacijski limfociti T (78). Veliki porast u broju leukocita tijekom sredine sekrecijske faze i rane trudnoće (75) upućuje na to da leukociti u endometriju imaju značajnu ulogu u nastanku spoja majčinih i fetalnih tkiva te imunološkom održavanju trudnoće. Nije u potpunosti poznato da li je porast u broju leukocita posljedica novačenja iz periferne krvi ili umnožavanja „in situ“ kao posljedica djelovanja hormona ili lokalnih topljivih čimbenika. Unatoč intenzivnom „in vitro“ istraživanju

leukocitnih populacija tijekom trudnoće, njihova „in vivo“ uloga nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavljena uloga je u nadziranju prodiranja trofoblasta (NK stanice i makrofagi), pregradnji spiralnih arterija (NK stanice) i imunološkom nadziranju (limfociti T, regulacijske T stanice i dendritičke stanice) (79).

1.5.1. Makrofagi

Makrofagi su stanice uključene u sve oblike imunološkog i upalnog odgovora, a čini se da igraju ključnu ulogu u povezivanju nespecifične i specifične imunosti (80, 81). Humani monociti i makrofagi su mononuklearne fagocitne stanice čija se matična mijeloidna stanica nalazi u koštanoj srži i usmjerava se u nekoliko vrsta progenitorskih stanica, uključujući i granulocitno-monocitne progenitorske stanice. Iz ovih progenitorskih stanica nastaju promonociti koji napuštaju koštanu srž i ulaze u krv (80). Nakon osmosatnog cirkuliranja promonociti se diferenciraju u zrele monocyte koji zatim ulaze u različite organe i tkiva. Različita izraženost površinskih biljega dijeli humane monocyte u dvije osnovne subpopulacije. Stanice CD14⁺/CD16⁻ predstavljaju 80-90% cirkulirajućih monocita, a izražavaju visoku razinu CC kemokinskog receptora (CCR) 2 i nisku razinu CXC3 receptora 1. U odgovoru na lipopolisaharide (LPS) proizvode nisku razinu upalnih citokina, ali luče IL-10. Suprotno tome CD16⁺ monociti izražavaju visoku razinu CXC3R1 i nisku razinu CCR2, ali luče upalne citokine (82).

Specifični čimbenici prisutni u različitim tkivima potiču konačnu pretvorbu monocita u tkivne makrofage koji su izrazito raznolika skupina stanica (83). Glavna uloga makrofaga je fagocitirati i uništi mikroorganizme, ubiti virusima zaražene i maligne stanice te kao antigen predočne stanice, predočiti antigen limfocitima T. Važni su u održavanju tkivne homeostaze i u procesima cijeljenja tkiva zbog sposobnosti fagocitoze i probavljanja mrtvih stanica (84). Kontroliraju druge upalne stanice stvarajući različite čimbenike rasta, kemokine, citokine, proteolitičke enzime i adhezijske molekule (85, 86).

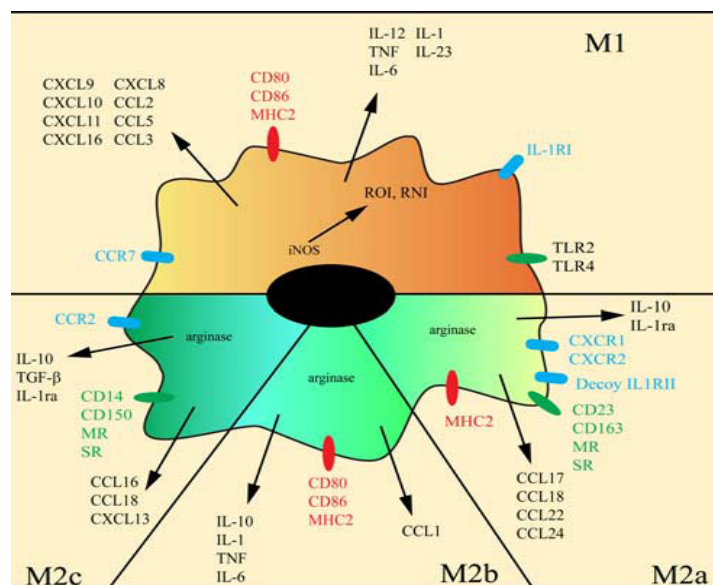
1.5.1.1. Podvrste makrofaga

Makrofagi se mogu stimulirati in vitro različitim tvarima i potaknuti njihova dva osnovna puta sazrijevanja. Klasično aktivirani ili tip 1 makrofaga (M1) nastaju u odgovoru na interferon (IFN)- γ , TNF- α i LPS, pokazuju pro-upalnu orijentaciju i važni su u uklanjanju unutarstaničnih patogena (87), dok alternativno aktivirani ili tip II makrofaga (M2), potaknuti Th-2 citokinima, izražavaju protu-upalna svojstva i omogućuju obnavljanje tkiva te su važni za ubijanje izvanstaničnih parazita (88). Alternativno aktivirani makrofagi dijele se na M2a, M2b i M2c u ovisnosti o stimulaciji citokinima (89). M2a nastaju uslijed stimulacije s IL-4 i IL-13. Stimulacijom imunokompleksima i ligandima za TLR (od engl. Toll like receptor) 4 kao što su LPS i interleukin (IL)-1 β nastaje M2b subpopulacija makrofaga, a M2c subpopulacija nastaje nakon stimulacije s IL-10 (89, 90). U protu-upalne makrofage ubrajaju se još i makrofagi udruženi s tumorima te nezrele, monocitima slične ili zrele, neutrofilima slične supresijske stanice mijeloidnog podrijetla. Kako za poticanje ovih stanica nisu potrebni IL-4 i IL-13, ove makrofagne populacije se ne smatraju alternativno aktiviranim (91). Makrofagi se ne nalaze u stanju trajne diferencijacije kao npr. Th 1 ili Th2 limfociti, već pokazuju određenu plastičnost te mogu postati M1 ili M2 makrofagi ovisno o lokalnim uvjetima (92). Kakva je veza između monocitnih subpopulacija i polarizacije makrofaga nije u potpunosti poznato, ali pokazano je na modelu upale kod akutnog infarkta miokarda da se Gr1⁺ stanice, koje predstavljaju mišje monocite koji se boje protutijelom protiv Ly6C antigena, nazivaju se i upalnim te polariziraju prema M1 makrofagima, a Gr1⁻ stanice prema M2 stanicama (93). Međutim ostaje nepoznato da li je ova polarizacija trajna ili samo privremena i ovisna o izloženosti različitim uvjetima iz okoline (82).

1.5.1.2. Biološka uloga makrofaga

Klasično aktivirani tip I makrofaga pod utjecajem CSF-a (od engl. Colony stimulatory factor) se umnožavaju „in situ“ i sazrijevaju u stanice koje se ne dijele. Nakon kontakta s antigenom ili mikroorganizmom, a pod utjecajem upalnih citokina, ti makrofagi postanu aktivirani. Ova aktivacija dovodi do porasta stvaranja otrovnih radikala, dušikovog oksida i hidrolitičkih lizosomalnih enzima. Aktivirani makrofagi luče citokine, TNF- α i IL-1 koji potiču upalu kako bi privukli fagocite, a luče i IL-12 koji omogućava naivnim limfocitima T da postanu Th1 stanice (87). Nekontrolirani upalni odgovor može uzrokovati oštećenje tkiva te je u određenom trenutku potrebno stišati imunološki odgovor kako bi se omogućio oporavak tkiva. Stoga faza bolesti, tkivo i citokini u mikrokolišu potiču „in vivo“ raznolike populacije makrofaga koje izražavaju odgovarajući fenotip (94). Alternativna aktivacija makrofaga potaknuta je citokinima koji se stvaraju u Th2 staničnom odgovoru, u alergijama, staničnom i humoralnom odgovoru na parazite, ili u odgovoru na deaktivirajuće citokine kao što je IL-10 ili TGF- β , glukokortikoidi, imunokompleksi, IL-1 β (95). Fenotipski M2a i M2b makrofagi izražavaju sličnu razinu površinskih biljega CD11a, CD40, CD54, CD58, CD80 i CD81 kao i klasično aktivirani makrofagi (95). Pokazuju jaku fagocitnu i endocitnu sposobnost, izražavaju visoku razinu MHC II molekula i mogu predočiti antigen te su sposobni usmjeravati imunološki odgovor. Suprotno klasično aktiviranim makrofagima, M2a/M2b potiču Th2 stanični odgovor što dovodi do ubijanja parazita, ali može dovesti i do pogoršanja patoloških stanja udruženih s Th2 staničnim odgovorom (96, 97). Stanice M2 luče smanjenu razinu upalnih citokina, a luče velike količine protu-upalnih citokina kao što su IL-10 i TGF- β i tako stišavaju upalni odgovor potaknut M1 makrofagima. Iznimka su M2b makrofagi koji su funkcionalno protu-upalni, ali zadržavaju stvaranje visoke razine upalnih citokina i otrovnih proizvoda (96). M2 luče cijelu paletu kemokina. M2a luče CCL24, 17 i 22, M2b luče CCL1, a M2c CCL18 i 16 (95). Citokini koji omogućuju nastanak M2 makrofaga, smanjuju aktivnost transkripcijskih faktora NF- κ B i STAT1 i na taj način

smanjuju stvaranje upalnih kemokina CXCL1, 2, 3, 5, 8, 9 i 10 te CCL2, 3, 4, 5 koji su povezani s M1 makrofagima (95). Makrofagi M1 prepoznaju, fagocitiraju i uklanjaju različite patogene koji se vežu na receptore koji su izravno povezani s poticanjem NF- κ B kao što je TLR4 (98). Citokini IL-4/IL-13 i/ili IL-10 povećavaju razinu neopsonizirajućih receptora kao što su manozni receptor (99), dectin-1, CD209 (100), CD163 (101) koji su sposobni prepoznati vlastite i strane antigene te sudjeluju u homeostazi i fiziološkom odstranjenju stanica u normalnim uvjetima (102). Različit je nadzor lučenja komponenti IL-1 sustava gdje M2 stanice imaju nisku razinu IL-1 β , kaspaze 1, a visoku razinu IL-1Ra i receptora mamilica tipa II. U odgovoru na protu-upalne citokine, makrofagi povećano stvaraju MDC i CCL17 ili TARC (od engl. Thymus and activation regulated chemokine) koji privlači antigen predodčne stanice na mjesto upale. Interleukin-4 povećava stvaranje TREM-2 koji potom smanjuje stvaranje citokina i ograničava aktivaciju makrofaga. Povećava se izraženost IL-27 receptora i IL-4 receptora na makrofagima kako bi se stišao upalni odgovor, a potiče se tkivna pregradnja povećanim stvaranjem fibronektina i arginaze koji omogućuju umnožavanje stanica i stvaranje kolagena (103). Ostali čimbenici koje luče M2 makrofagi, a odgovorni su za pregradnju tkiva su TGF- β , PDGF- (od engl. Platelet derived growth factor) AA, PDGF-BB, fibronektin (104), faktor koagulacije XIIIa (105). M2 stišavaju Th1 imunološki odgovor povećanjem broja regulacijskih limfocita T (106), a povećano stvaranje arginaze 1 u odnosu na iNOS (od engl. Inducible nitric oxide syntase)/NO ih čini učinkovitim u uklanjanju parazitnih infekcija, ali znatno smanjuje njihovu sposobnost ubijanja unutarstaničnih patogena (107, 108). Navedene osobitosti pojedinih subpopulacija makrofaga prikazane su na Slici 4.



Slika 4. Osnovne fenotipske i funkcijske osobitosti pojedinih subpopulacija makrofaga. Prilagođeno iz Benoit M, J. Immunol. 2008;181;3733-3739

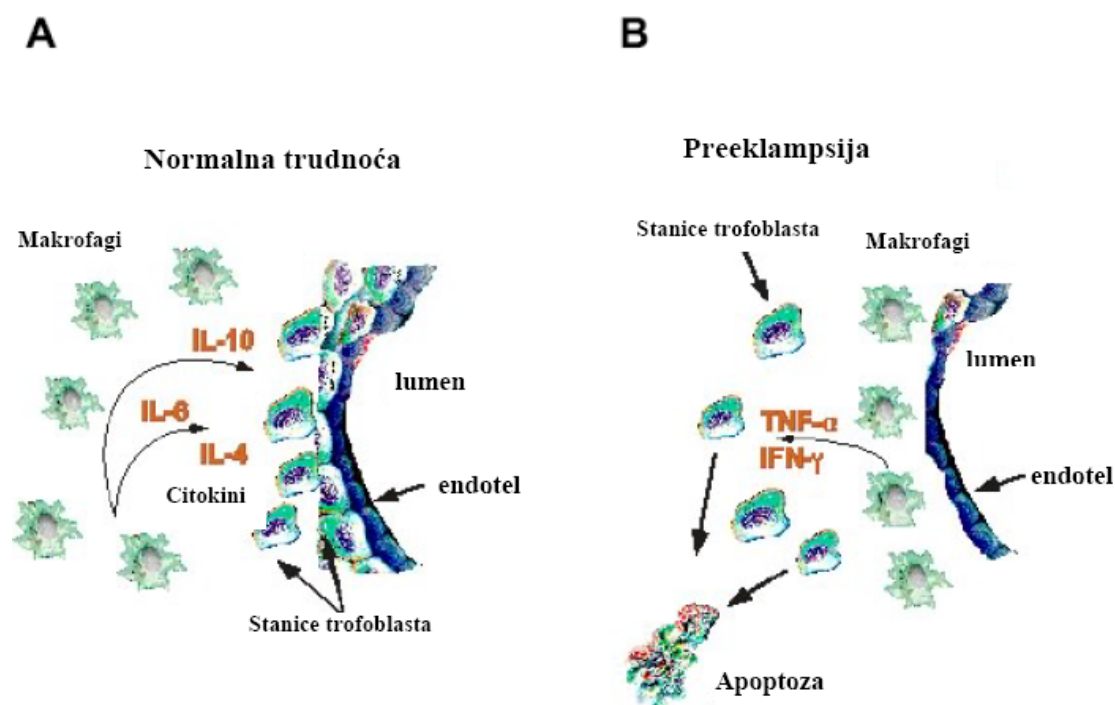
M2 povezuju se s Th2 odgovorom i obnavljanjem tkiva, jer se smatra da povećavaju fibrozu povećanjem izraženosti čimbenika kao što je fibronektin, matriks metaloproteinaze, IL-1 β i TGF- β . (91). M2 stanice potiču ubijanje različitih patogena, prisutne su pri nastanku tumora i potiču njihov rast, potiču obnavljanje tkiva i njihovu pregradnju te imaju regulacijsku funkciju. Smatra se da su alternativno aktivirani makrofagi prisutni u tkivima kada je potrebno zaštititi određeni organ od neželjene i pretjerane upale i imunološke reaktivnosti. Ove stanice nalaze se u normalnoj posteljici i plućima gdje štite od neželjene upale (109). Nalaze se tijekom faze popravka akutnog upalnog procesa kao i kod kroničnih upalnih bolesti kao što je reumatoidni artritis (110). Različite studije su pokazale zaštitnu ulogu sinovijalnih makrofaga tijekom proteoglikanima potaknutog artritisa i to smanjenjem stvaranja pro-upalnih citokina i kemokina što smanjuje nagomilavanje upalnih stanica u zglob (111). Ponomarev i sur. (112) su na modelu autoimunog encefalitisa pokazali da alternativno aktivirani makrofagi nadziru upalne procese središnjeg živčanog sustava. Prisutni su u mozgu bolesnika s Alzheimerovom bolesti (113). Makrofagi koji izražavaju CD163 imaju središnju ulogu u uklanjanju hemoglobina i na taj način

smanjuju oksidativni stres koji doprinosi nastanku ateroskleroze (114). Zaštitna uloga alternativno aktiviranih makrofaga je složena sudeći prema ovim podacima i čini se manje povoljna nego što se do sada činilo (115).

1.5.2. Makrofagi na spoju majčinih i fetalnih tkiva

1.5.2.1. Smještaj makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva

U decidui rane trudnoće stanice NK smještene su uglavnom u blizini spiralnih arterija i žlijezda, a makrofagi se nalaze u blizini citotrofoblasta, stupaju u međudjelovanje s trofoblastnim populacijama i prodiru u spiralne arteriole u decidui basalis i miometriju (116, 117.). Histološka analiza posteljice pokazuje u većini slučajeva veliki broj makrofaga koji su smješteni pretežno u blizini stanica koje podliježu apoptozi (118) te su najbrojnije stanice majčinog i fetalnog dijela na spoju maternice i posteljice (119). Gusta infiltracija makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva ukazuje da te stanice imaju, osim uobičajene, i specifičnu funkciju na mjestu implantacije (120). Makrofagi vjerojatno pomažu pregradnji tkiva koja je nužna za rast trofoblasta (121). Međutim, oni nisu samo stanice koje uklanjaju umiruće stanice već i aktivno upravljaju apoptozom nepoželjnih stanica (122). U normalnoj trudnoći unošenje apoptotičkih stanica potiče lučenje Th2 citokina i potiskivanje imunološkog odgovora (118). Za vrijeme prodiranja trofoblasta, makrofagi se nalaze u blizini spiralnih arterija. Za vrijeme normalne trudnoće makrofagi se nalaze u stromi i okružuju transformirane spiralne arterije, izvanresičasti trofoblast i žlijezde (118), dok su kod preeklampsije smješteni u lumenu spiralnih arterija i oko njih (118) te tako u normalnim okolnostima olakšavaju prodiranje trofoblasta, a u patološkim stanjima čine prepreku prodiranju trofoblasta i onemogućavaju njegovu diferencijaciju poticanjem apoptoze i onemogućavanjem pregradnje spiralnih arterija (Slika 5) (118).



Slika 5. Smještaj makrofaga tijekom normalne trudnoće i preeklampsije.

Prilagođeno iz Mor G, Reproductive immunology and Endocrinology 2003; 1:8

1.5.2.2. Regulacija broja makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Broj makrofaga u endometriju se mijena ovisno o fazi endometrijskog ciklusa.(123) Kod miša gustoća im je najmanja tijekom diestrusa kada je koncentracija estrogena najniža i povećava se na 20% stromalnih stanica tijekom proestrusa pod utjecajem estrogena (121). Cikličke promjene u broju makrofaga obilježje je i endometrijskog ciklusa kod žena. Broj makrofaga povećava se za 45% između proliferacijske i rane sekrecijske faze (124). Za razliku od glodavaca u kojih gustoća makrofaga pada kako se bliži kraj ciklusa, broj makrofaga kod žena se povećava kako se približava kasna sekrecijska faza endometrijskog ciklusa. Ova razlika vjerojatno je posljedica odstranjenog promjenjenog sloja endometrija i njegovog popravka tijekom menstrualnog krvarenja u kojem bi makrofagi mogli imati značajnu ulogu, a koje je prisutno kod žena te odsutno kod glodavaca (121). Epitelne stanice maternice miša pod utjecajem steroidnih hormona stvaraju različite citokine koji sudjeluju u

privlačenju makrofaga, njihovom preživljavanju, diferencijaciji i funkciji, a sami makrofagi izražavaju receptor za estrogen i glukokortikoide te estrogeni znatno utječu na seljenje i funkciju makrofaga (125). Kolonija stimulirajući faktor -1 (CSF-1), kolonija stimulirajući faktora granulocita i monocita (GM-CSF), TNF- α i IL-6 mogu privući monocite iz krvi u tkivo. Estrogeni i progesteron povećavaju lučenje CSF-1, dok je lučenje GM-CSF povećano pod utjecajem estrogena, a umjereno smanjeno progesteronom (125.). Epitelne stanice maternice stvaraju CSF-1, a istraživanja na miševima pokazala su da je CSF-1 glavni u nadzoru broja stromalnih makrofaga u maternici budući da je kod miševa koji nemaju gen za CSF-1 njihov broj izrazito smanjen. Kod ljudi postoji povećano stvaranje CSF-1 na spoju majčinih i fetalnih tkiva u vrijeme implantacije (126), a njegovo se stvaranje nastavlja u epitelnim stanicama maternice tijekom trudnoće (92, 127). Decidualni limfociti T izdvojeni iz decidue žena koje boluju od ponavljajućih spontanih pobačaja imaju smanjeno stvaranje CSF-1, kao i drugih citokina, uključujući i LIF (od engl. Leukemia inhibitory factor) (128). Estrogeni također smanjuju lučenje čimbenika MIF (od engl. Macrophage inhibitory factor) i upalnih kemokina koji pomažu u cijeljenju tkiva, ali smanjuju seljenje makrofaga u tkiva (129). Član IL-6 obitelji, LIF je visoko glikozilirana bjelancevina molekularne mase 40-50 kDa sa širokom paletom bioloških funkcija (130). Dio svojih učinaka LIF sigurno ostvaruje i preko makrofaga. Usporedba miševa koji nemaju gen za LIF i divljeg tipa upućuje na to da LIF ima značajnu ulogu u raspodjeli leukocita. Gusotoća makrofaga trećeg dana trudnoće je smanjena gotovo na polovicu kod miševa kojima nedostaje gen za LIF, a poremećena je njihova raspodjela što upućuje na to da LIF utječe na seljenje ovih stanica (31). Pokazano je da LIF privlači makrofage i u drugim tkivima kao što je središnji živčani sustav gdje djeluje s drugim kemokinima kao što je IL-6 i onkostatina M (32), a također dovodi do sazrijevanja makrofaga (33).

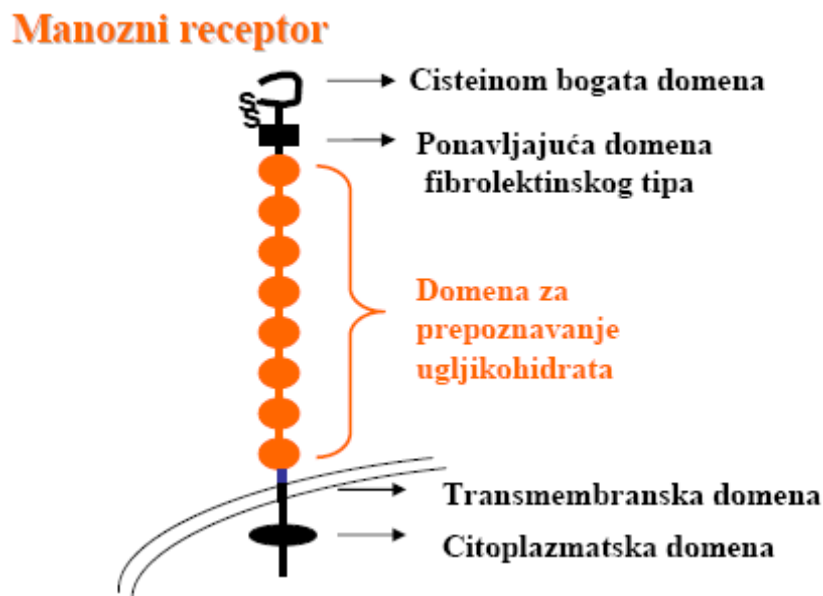
1.5.2.3. Osobitosti decidualnih makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Uterine stanice NK (CD56^{bright}CD16^{dim}) specifičnog fenotipa različitog od onog stanica NK periferne krvi prevladavaju tijekom rane trudnoće i čine gotovo 70% svih leukocita na spoju majčinih i fetalnih tkiva, ali podliježu opsežnoj apoptozi nakon trofoblastne infiltracije i prividno su odsutne na terminu poroda (134). Makrofagi čine sljedeću najveću populaciju decidualnih leukocita rano u trudnoći i čine 20-30%, no za razliku od stanica NK ostaju relativno nepromjenljivi kroz trudnoću (135). Smješteni su uz citotrofoblast, u bliskom odnosu s trofoblastom pa nije začuđujuće da mnogi ligandi koji se nalaze na trofoblastnim stanicama imaju receptore na makrofagima (136).

Makrofagi izražavaju brojne površinske biljege kao što su koreceptor za LPS, CD14 molekul, zatim lisosomalni CD68, kiselu fosfatazu, renin-nespecifičnu esterazu, lisozime i različite citokine i kemokine (137). Iz decidualnih makrofaga ne mogu nastati dendritičke stanice. Oni izlučuju protu-upalne citokine kao što je IL-10, enzim indolamin-dioksidogenaza (IDO), a izražavaju niske razine kostimulacijskih molekula za limfocite T, CD80 i CD86 (138). Smanjena izraženost kostimulacijskih molekula CD86 kao i HLA-DR molekula na makrofagima decidue rane trudnoće u usporedbi s monocitima periferne krvi trudnih žena i žena koje nisu trudne upućuje na smanjenu sposobnost predočavanja antigena u decidui (138). Makrofagi su također uključeni u fagocitozu i pregradnju tkiva, a izražavaju nekoliko vrsta molekula HLA razreda II, uključujući HLA-DR, -DP i -DQ, kao i CD209 te manozni receptor (138, 139), endocitni receptor koji ima potencijalnu ulogu u hvatanju i prijenosu antigena (140, 60).

Približno 70% decidualnih makrofaga izražava endocitni receptor CD 206 ili manozni receptor (MR). Tip I membranskog proteina, MR pripada u obitelj lektinskih receptora (141). Sastoji se od tri različita izvanstanična dijela: cisteinom bogata

domena, ponavljajuća domena fibrolektinskog tipa II i domene za prepoznavanje ugljikohidrata kao što je prikazano na Slici 6.



Slika 6. Prikaz strukture manoznog receptora. Prilagođeno iz Nature Reviews, 2002, Vol. 2: 77-84.

Domena za prepoznavanje ugljikohidrata je sposobna vezati mucine sekrecijske faze kao što je MUC I i njemu slične glikoproteine, kao što je TAG-72 (60). Vjerojatno je da sam manozni receptor nije odgovoran za fagocitozu već za vezanje čestica s terminalnim manoznim ostacima nakon čega aktivira klasične fagocitne receptore koji aktiviraju proces fagocitoze koji dovodi do uklanjanja mikroorganizama, neželjenih stanica i stanica koje podliježu apoptozi te čini značajnu ulogu u nespecifičnoj i specifičnoj imunosti i preinačavanju tkiva (142).

1.5.2.4. Alternativno aktivirani makrofagi na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Kao što je već spomenuto „in vitro“ postoje dvije populacije makrofaga. Klasično aktivirani ili tip 1 makrofaga pro-upalnih osobina (87) i alternativno aktivirani ili tip II makrofaga, protu-upalnih karakteristika (88). Iako se sa sigurnošću ne može reći kojoj skupini pripadaju decidualni makrofagi, citokini, čimbenici rasta i proteaze koje luče alternativno aktivirani makrofagi mogli bi omogućiti tkivnu pregradnju i snošljivost na trofoblastne antigene kao i utjecati na diferencijaciju trofoblasta i njegovo ponašanje. Zapravo, i same stanice trofoblasta luče kemokine kao što su MCP-1, IL-8 koji su sposobni privući makrofage, te potiče seljenje monocitne stanične linije THP-1 kao i CD14⁺ monocita iz krvi (143). Povećani izražaj kemokinskog liganda CCL2, CCL3, CCL5 i GM-CSF u maternici trudnih miševa upućuje na to da su ove molekule uključene u privlačenje makrofaga koji izražavaju receptore za navedene kemokine (144). Osim toga humane glandularne epitelne stanice, stromalne stanice (145) i trofoblast (146) luče MIF što dovodi do nakupljanja makrofaga u njihovoj blizini.

Granuloza stanice i epitelne stanice maternice stvaraju CSF-1 koji lokalno sprječava sazrijevanje dendritičkih stanica koje nisu sposobne predložiti antigene i potiču razvoj makrofaga koji potiskuju upalni odgovor (147). Citokini koji usmjeravaju makrofage prema citotoksičnom i antigen predložnom fenotipu su GM-CSF, IFN- γ i IL-12, a omjer između CSF-1 i GM-CSF je ključan u nadzoru između prou-palnog i protu-upalnog fenotipa (148). U ženskom reproduktivnom sustavu, ravnoteža između estrogena i progesterona doprinosi ravnoteži između ova dva citokina budući da estrogen stimulira nastanak i CSF-1 i GM-CSF dok progesteron stimulira sintezu CSF-1, a inhibira GM-CSF (149.)

U decidui makrofagi izražavaju molekule koje stišavaju upalu i potiču tkivnu pregradnju kao i snošljivost fetalnih antigena. Dokazi o ovom su malobrojni, a

uključuju izraženost biljega kao što su VEGF, IL-10, Stabilina I, FXIIIa, (139). Signal prenesen u stanicu putem MR narušava Th1 stanični odgovor potaknut aktivacijom Toll-like receptor-4 (150) potiče funkcijsko sazrijevanje decidualnih makrofaga. Molekula HLA-G nishodno regulira funkcije decidualnih makrofaga usljed vezanja s imunoglobulinu sličnim transkripcijskim inhibicijskim receptorima (ILT2 i ILT4) (151). Ovo opisuje decidualne makrofage rane trudnoće kao protu-upalne i snošljive stanice, iako ne stvaraju enzim za razgradnju triptofana, IDO (139.). Makrofagi koji se nakupljaju oko žlijezda u maternici tijekom trudnoće izražavaju gp49B, inhibicijski receptor koji nakon vezanja s FcγRI potiskuje stvaranje TNF-α u makrofagima „in vitro“ (152).

Posebno je važno međudjelovanje između decidualnih makrofaga i stanica NK. Makrofagi su glavne HLA-DR⁺ stanice koje održavaju izraženost perforina, kratkoročnog citolitičkog medijatora i povećavaju citotoksičnost decidualnih limfocita protiv NK osjetljive stanične linije humane eritroleukemije K-562, pomoću povećanog stvaranja IL-15 (70). Perforin je međutim uključen u ubijanje aktiviranih makrofaga u glodavaca, što se može zaključiti iz činjenice da miševi kojima nedostaje gen za perforin i FasL razvijaju upalu maternice i jajovoda s izrazitim umnažanjem makrofaga (153). Odsustvo apoptoze CD14⁺ stanica u decidui rane trudnoće (154.) upućuje na to da perforinom posredovana nekroza makrofaga ima značajnu ulogu (58).

Danas se pretpostavlja da je decidualni imunosupresivni mikrokoliš nužan za razvoj imunološke snošljivosti na fetalne aloantigene i održanje normalne trudnoće, a brojni poremećaji trudnoće se povezuju s pretjeranim stvaranjem pro-upalnih molekula (155). Tijekom trudnoće dolazi do pomaka u stvaranju citokina, s Th-1 prema Th-2, kako na sustavnoj razini tako i na spoju majčinih i fetalnih tkiva. Stoga se pretpostavlja da je trudnoća stanje promijenjene imunološke sposobnosti u kojoj monociti i granulociti pokazuju povećanu izraženost aktivacijskih čimbenika, ali stvaraju manje pro-upalnih citokina vjerojatno zbog kočenja NF-κB, primarnog

transkripcijskog faktora odgovornog za sintezu Th-1 citokina (156). Pokazano je da monociti periferne krvi trudnica luče više Th-2 nego Th-1 citokina u usporedbi s ženama koje nisu trudne (157). Ovakvo poticanje moglo bi zaštititi fetus od odbacivanja posredovanog pro-upalnim citokinima, a u isto vrijeme omogućiti obranu od infekcija mikroorganizmima. Što uzrokuje promjenu imunološkog odgovora u Th-2 tip nije sa sigurnošću poznato, ali se zna da pri određivanju aktivnosti monocita značajnu ulogu imaju hormoni. Progesteron kao i glukokortikoidi potiču stvaranje Th-2 citokina kao što su IL-4 i IL-10 (158.). Glukokortikoidi su molekule koje snažno potiskuju imunološki sustav, a povišeni su u perifernoj krvi trudnih žena uz odgovarajuće povećanje zone fascikulate nadbubrežne žlijezde (159). Progesteron (160) i glukokortikoidi (161) potiskuju aktivnost ciklooksigenaze i stvaranje citokina kao što su IL-1, -2, -3, -5, -8, IFN- γ i TNF- α , inhibirajući NF- κ B transkripcijski faktor. HCG također smanjuje stvaranje pro-upalnih citokina u monocitima (160). Stoga bi povećana razina ovih hormona tijekom trudnoće mogla imati značajnu ulogu u potiskivanju lokalnog i sistemskog Th-1 citokinskog odgovora, te preusmjeravanju stvaranja Th-2 citokina (162).

1.5.2.5. Biološka uloga makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Međudjelovanje decidualnih makrofaga s trofoblastnim stanicama je važno za uspješnu trudnoću. Uspješna, receptorom posredovana fagocitoza i uništavanje trofoblastnih stanica pomoću makrofaga omogućuje smanjenje upale koja u slučaju trudnoće može biti pogubna (144). Decidualni makrofagi mogu stupiti u vezu s trofoblastnim stanicama preko različitih parova receptor-ligand. Izražavaju c-kit, vaskularni VEGFR (od engl. Vascular endothelisa growth factor), ILT 2/4 i različite kemokinske receptore koji se vežu za odgovarajuće molekule na trofoblastu, Kit ligand, VEGFR receptor 1, molekule MHC razreda Ib, HLA-G i MCP (151, 163.). Makrofagi također izražavaju receptore za steroidne hormone LH/hCG, estrogen i glukokortikoidne (164) kao i receptore za komponente komplementa, imunoglobuline,

citokine, kemokinske ligande (CCL i CXCL), čimbenike rasta, šećere, peptide, bioaktivne lipide, čimbenike koagulacije, lektine, adhezijske molekule i komponente matriksa (165). Obzirom na veliki broj molekula koje luče i receptora koje izražavaju, ovi makrofagi igraju presudnu ulogu u decidualnoj homeostazi i regulaciji trofoblastne funkcije, ali točna priroda ovog međudjelovanja ostaje nepoznata (162).

Nažalost, specifična funkcija makrofaga u trudnoći nije još razjašnjena, ali iz poznatih činjenica o ulozi makrofaga u različitim tkivima može se nagađati o mogućoj ulozi. Alternativno aktivirani makrofagi mogli bi imati ulogu u potiskivanju majčinog imunološkog odgovora na fetalne aloantigene i poticanje snošljivosti. Makrofagi nadalje luče faktore kao što su IL-10, prostaglandin E2 (PGE₂), TGF- β , koji smanjuju umnožavanje limfocita, uključujući i one koji su usmjereni protiv zametka (162). U neoplastičnom tkivu prisutnost makrofaga koji su alternativno aktivirani dovodi do potiskivanja Th-1 imunološkog odgovora i bijega tumorskih stanica staničnoj smrti posredovanoj citotoksičnim limfocitima i stanicama NK (166). Alternativno aktivirani makrofagi su također vješti u tkivnoj pregradnji te bi mogli biti uključeni u procese implantacije blastociste i olakšati prodiranje trofoblasta. Makrofagi luče i nadziru različite proteaze, faktore rasta, kemokine, citokine i različite sastavnice matriksa i tako usklađuju tkivnu pregradnju i angiogenezu. Angiogeneza je posebice važna sastavnica tkivne pregradnje koja se pojačano događa za vrijeme implantacije blastociste i razvoja placente (162.). Alternativno aktivirani makrofagi su povezani sa znatnim stupnjem prožiljenosti „in vivo“, a uklanjanje monocita kod mišjih tumora je povezano s smanjenim prožiljavanjem tumora (162).

Tijekom tkivne pregradnje dolazi do apoptoze nepoželjnih i oštećenih stanica koje je potrebno ukloniti kako bi se spriječio odgovor imunološkog sustava na antigene kao i istjecanje štetnog sadržaja samih stanica. Makrofagi su fagociti sposobni ukloniti apoptotični stanični debris i na taj način štititi okolne stanice od upalne reakcije ili mogućeg štetnog staničnog sadržaja (118). Kao fagociti, makrofagi čine glavnu crtu obrane protiv prodirućeg patogena i mogli bi igrati ulogu u probiru i unošenju

mogućih štetnih materijala ili mikroba u decidui ili u sinciotrofoblastu tako da bi ovo mogao biti glavni mehanizam kojim makrofagi brane posteljicu i fetus od mogućih štetnih tvari (162).

1.5.1.2.6. Makrofagi u patološkim trudnoćama

Makrofagi su svestrane stanice koje vrše niz funkcija bitnih za uspješnu trudnoću. Međutim, nepravilno aktivirani, tip-1 makrofagi koji nastaju kao posljedica neodgovarajuće imunološke snošljivosti na fetalne antigene, infekciju ili prisutne upalne poremećaje mogli bi dovesti do poremećaja u normalnoj funkciji makrofaga s negativnim utjecajem na trudnoću. Cijeli spektar poremećaja trudnoće počevši od preeklampsije, preko fetalnog zaostajanja u rastu do spontanih i ponavljajućih pobačaja povezan je s izrazitim stvaranjem upalnih citokina i neprirodnom aktivacijom majčinih imunoloških stanica, uključujući i makrofage (162). Nekoliko autora pokušalo je istražiti broj makrofaga u preeklampsiji, ali rezultati su se razlikovali među skupinama. Reister i sur. opisali su da povećani broj decidualnih makrofaga okružuje spiralne arterije u miometriju u odsustvu izvanresičastog trofoblasta u posteljici žena koje boluju od preeklampsije dok u kontrolnoj skupini, u kojoj je prisutan izvanresičasti trofoblast, broj makrofaga je smanjen (136). Burk i sur. pokazali su smanjen broj CD14⁺HLA-DR⁺ stanica kod žena koje boluju od preeklampsije (167), Kim i sur. nisu našli razlike u broju CD14⁺CD68⁺ makrofaga u normalnim trudnoćama (168) i preeklampsiji dok su Loockwood i sur. našli povećan broj CD68⁺ makrofaga kod preeklampsije, a CD68⁺ stanice bile su smještene u decidui basalis (169). Smatra se da povećan broj makrofaga u preeklampsiji nastaje kao posljedica povećanog lučenja MCP-1 pod utjecajem TNF- α i IL-1 β što dovodi do povećanog seljenja makrofaga u deciduu. Osim što se ove studije razlikuju u protutijelima (CD14 i CD68) koja su korištena u istraživanjima, vjerojatno je da su razlike nastale i zbog različitog tkiva koje je korišteno (miometrij, Reister, 1999, decidua, Loockwood, 2006 i posteljica u vrijeme carskog reza, Bulmer, 2010.). Biopsije

posteljica kod ranih i kasnih pobačaja pokazale su povećan broj CD14⁺ makrofaga u decidui ranog aneuploidnog pobačaja kao i povećan broj u ranim i kasnim spontanim pobačajima kod kromosomski normalnog zametka (170). Sva ova istaživanja provedena na decidui nakon spontanog pobačaja treba kritički razmatrati s obzirom na to da bi promjene u broju upalnih stanica mogle biti odgovorne za gubitak trudnoće. Međutim, broj makrofaga je povećan u sekrecijskoj fazi i endometriju žena koje imaju pozitivnu anamnezu ponavljajućih spontanih pobačaja (171).

Smanjena prokrvljenost posteljice prisutna je kod različitih patoloških stanja u trudnoći, a moguće je da je posljedica smanjene količine cirkulirajućeg angiogenetskog faktora VEGF i njegovog homologa čimbenik rasta posteljice (PIGF), promjene u izraženosti njihovih receptora VEGFR1, 2 i 3 i sustavne i lokalne povišene količine topljivog VEGF receptora 1 (sVEGFR1) (162). Mehanizam koji dovodi do povišene razine sVEGFR1 nije poznat, međutim jedan od izvora su svakako monociti stimulirani pro-upalnim medijatorima kao što su komponente komplementa (172). „Nepravilno“ aktivirani makrofagi koji su prisutni u većoj količini na spoju majčinih i fetalnih tkiva tijekom patoloških trudnoća predstavljaju dodatni izvor sVEGFR1 koji onda smanjuje prožiljenost i uvelike pridonosi pogoršanju ovih patoloških stanja (162).

Diferencijacija izvanresičastog trofoblasta u prodirući oblik i njegovo seljenje u stromu maternice ključne su za pravilan razvoj posteljice (173). U trudnoćama kompliciranim preeklampsijom i u određenim slučajevima zaostajanja u rasta ploda i pobačajima, dolazi do nedovoljnog prodiranja trofoblasta i pregradnje krvnih žila (173, 174.) što dovodi do hipoperfuzije posteljice, trajnog odgovora spiralnih arterija na vazoaktivne molekule i postupnog razvoja oksidativnog stresa u trećem tromjesečju (175). Reister i suradnici (136) su pokazali da postoji izrazito nakupljanje aktiviranih makrofaga oko spiralnih arterija u patološkim trudnoćama kao i smanjena sposobnost prodiranja trofoblastičkih stanica. Budući da su patološke trudnoće većinom udružene s pojačanom upalom, moguće je da decidualni leukociti

doprinosi smanjenom prodiranju trofoblasta. Pokazano je također da LPS, koji snažno potiče stvaranje Th 1 citokina u makrofagima, uzrokuje smanjeno prodiranje stanica izvanresičastog trofoblasta „in vitro“ (176). Makrofagi koji su aktivirani Th1 citokinima luče različite molekule koje mogu doprinjeti smanjenom prodiranju trofoblasta. Jedan od takvih citokina je svakako TNF- α kojeg makrofagi luče u izobilju, a koji je povišen u trudnoćama s preeklampsijom (177) i rekurentnim pobačajima (178.). Čimbenik TNF potiče apoptozu trofoblastičkih stanica što je učinkovit način ograničavanja endovaskularnog prodiranja ovih stanica (179). Također mijenja izraženost i poticanje proteaza koje razgrađuju matriks na trofoblastičkim stanicama (180). Osim ovog citokina, Th1 aktivirani makrofagi luče i velike količine iNOS s posljedičnim povećanim lučenjem NO. Kod žena s preeklampsijom postoji povećano stvaranje nitrata i nitrita koji su metaboli ti NO (181). Pokazano je da NO mimetik, isosorbid dinitrat i glicerol trinitrat značajno smanjuju prodiranje trofoblasta „in vitro“ (182). Th1 aktivirani makrofagi također luče TGF- β koji kao i prethodno navedeni medijatori uzrokuju smanjeno prodiranje trofoblasta i smanjenu izraženost matriks metaloproteaza (183). Stromalne stanice normalno luče TGF- β , međutim „nepravilno“ aktivirani makrofagi luče velike količine ovog citokina, što može dovesti do preranog smanjenja invazivnosti trofoblastičkih stanica (162).

„Nepravilno“ aktivirani makrofagi utječu i na povećanu apoptozu trofoblastičkih stanica. Zapravo citokini koje luče Th1 aktivirani makrofagi, TNF i IFN- γ , povećavaju osjetljivost trofoblastičkih stanica prema apoptози (184). Nadalje, ovi citokini povećavaju izraženost Fas molekule na trofoblastičkim stanicama koja se veže na FasL molekulu koja potiče apoptozu (185), te povećavaju izraženost pro-apoptotičkog faktora XAF1 koji potiče staničnu smrt ovisnu o kaspazama (186). Smanjeno prodiranje trofoblasta i nedovoljno preinačavanje spiralnih arterija što uzrokuju čimbenici koje luče „nepravilno“ aktivirani makrofagi dovodi do trajne osjetljivosti spiralnih arteriola na vazoaktivne molekule što dovodi do ciklusa hipoksije/reoksigenacije i oksidativnog stresa (162). Stanice posteljice izložene

oskidativnom stresu podliježu apoptozi. Povećana količina stanica koje podliježu apoptozi kao i nedovoljno uklanjanje mrtvih stanica potiče makrofage na još veće stvaranje Th1 citokina i time pogoršavaju već postojeće patološko stanje u trudnoći (162).

1.5.3. Stanice NK

Humane stanice NK koje se nalaze u perifernoj krvi, različitim limfoidnim i nelimfoidnim organima potječu iz CD34⁺IL-2Rβ⁺ hematopoetske progenitorske stanice (187). Stanice NK periferne krvi čine 8-10% cirkulirajućih mononuklearnih stanica. (188). Važna su sastavnica nespecifične imunosti i osiguravaju obranu protiv različitih virusa, intracelularnih bakterija i maligno promijenjenih stanica bez prethodne senzibilizacije na antigen koji ne mora biti predočne u sklopu MHC molekula (80, 189, 190). Prepoznaju svoje ciljne stanice pomoću različitih aktivacijskih i inhibicijskih receptora koji prepoznaju patogene molekule ili strane molekule, vlastite bjelančevine koji su pojačano izražene na transformiranim ili virusom inficiranim stanicama ili vlastite bjelančevine koje su normalno izražene na stanicama, ali snižene u tumorskim stanicama ili onima zaraženim virusima (191, 192). Ravnoteža između aktivacijskih i inhibicijskih signala nadzire aktivaciju ovih stanica (191, 192, 193). Većini stanica NK svojstven je nedostatak CD3 molekule na površini, ali i prisustvo CD56 ili NCAM (od engl. Neural cell adhesion molecule) antigena. Na temelju jačine bojenja CD56 antigena, tj. prosječnog broja CD56 molekula po pojedinoj stanici, CD56⁺ stanice se dijele na CD56^{+bright} i CD56^{+dim}. Daljnja podjela na NK stanične subpopulacije temelji se na prisustvu ili odsustvu FcγRIII ili CD16 antigena. Većina stanica NK periferne krvi je CD56^{+dim}CD16⁺ dok su preostale CD56^{+bright}CD16⁻ (194). U limfnim čvorovima stanice NK izražavaju CD56^{+bright}CD16⁻ fenotip (194, 195). CD56^{+bright} stanice NK učinkovitije su u stvaranju citokina, posebice IFN-γ, dok su CD56^{+dim} stanice NK profesionalne ubojice štetnih stanica „in vivo“ (195). CD56^{+bright}CD16⁻ NK stanice izražavaju CD62 ligand i

kemokinski receptor CCR7 i CXCR4 i različite adhezijske molekule što objašnjava zašto se ove populacije nalaze u sekundarnim limfnim organima (196, 197). CD56^{dim} stanice izražavaju visoku razinu CXCR1 i CX3CR1 koji su povezani s migracijom limfocita na mjesto upale (198). Molekularni mehanizam koji dovodi do izraženije sposobnosti CD56^{dim} stanica da ubijaju druge stanice vjerojatno je posljedica razlike u intracelularnom signaliranju između NK staničnih populacija koje su odgovorne za njihovu citotoksičnu sposobnost. Signalna adapterska molekula, CD3ζ, slabije je izražena u CD56^{bright} stanicama NK u usporedbi s CD56^{dim} stanicama NK (199), a ove se ističu sposobnošću da stvaraju nespecifične zaštitne čimbenike (amfiregulin, lizozim) protiv gljivica i drugih patogena kao i da luče citokine kao što je IL-10, koji potiskuju imunološki odgovor (199).

1.5.3.1. Podrijetlo stanica NK u maternici

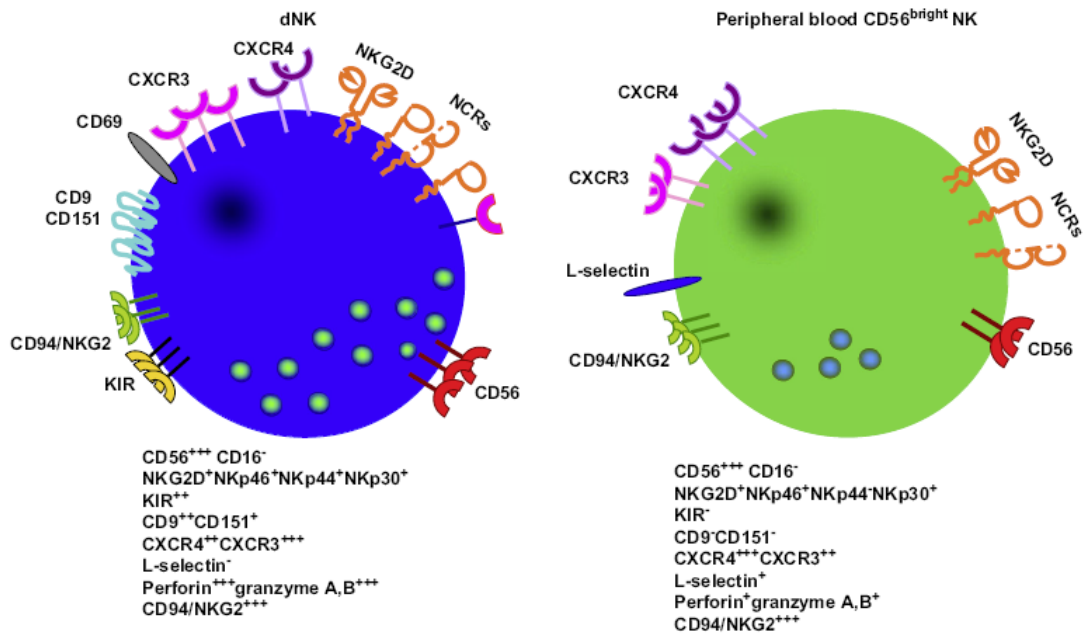
Podrijetlo stanica NK maternice nije u potpunosti razjašnjeno, a dosadašnja istraživanja upućuju na različite mogućnosti. Jedna od njih je svakako mogućnost da stanice NK maternice potječu od CD56^{bright}CD16⁻ stanica NK periferne krvi, a temelji se na činjenici da ove stanice izražavaju CXCR4 koji im omogućuje da putuju prema svom ligandu CXCL12 koji se nalazi izražen na stanicama izvanresičastog trofoblasta (197, 200). Međutim, nije moguće na isti način objasniti porast broja stanica NK tijekom sekrecijske faze endometrijskog ciklusa, ali bi progesteron i estrogen mogli potaknuti migraciju CXCR3 pozitivnih CD56^{bright} stanica periferne krvi dovodeći do povećane izraženosti CXCL10 i CXCL11 u endometriju (201, 202). Sljedeća mogućnost je da stanice NK maternice potječu od CD56^{dim}CD16⁺ stanica periferne krvi koje dolaze u endometrij. Pod utjecajem kemokina, izraženih pod utjecajem estrogena ili progesterona, ove se stanice preobražavaju u decidualne stanice NK. Pokazano je da TGFβ kojeg stvaraju decidualne stromalne stanice može preobraziti CD56^{dim}CD16⁺ stanice NK u CD56^{bright}CD16⁻ stanice NK, upućujući na krajnju usmjerenost ovih stanica pod utjecajem specifičnih lokalnih čimbenika (203).

Međutim, ovo bi mogao biti reverzibilan proces budući da CD56^{bright}CD16⁻ stanice NK mogu biti preteče za CD56^{dim}CD16⁺ stanice NK (204). „In vitro“ pretvaranje CD56^{dim}CD16⁺ stanica NK u CD56^{bright}CD16⁻ stanice NK je složen proces koji je malo vjerojatno izvor decidualnih stanica NK (205). U decidui se nalazi mala (0.1%) populacija lim⁻CD34⁺CD45⁺ stanica koje mogu, pod utjecajem čimbenika koje luče stromalne stanice, kao što je IL-15 ili faktor progenitorskih stanica, prijeći u CD56^{bright}CD16⁻ stanice NK (203). Međutim, brojni faktori koji bi mogli dovesti do ovoga zapravo nisu prisutni u edometriju (205). Najvjerojatniji mehanizam nastanka stanica NK maternice je umnožavanje postojećih stanica NK pod utjecajem hormona. „In situ“ umnožavanje je moguće budući da CD56^{bright}CD16⁻ stanice NK izražavaju receptore za prolaktin, estrogen β i glukokortikoide (206, 207). Progesteron, hCG i prolaktin mogli bi djelovati neizravno preko stromalnih stanica ili izravno preko glukokortikoidnog receptora i utjecajem na K kanale, što podupire umnožavanje CD56^{bright}CD16⁻ stanica NK (208, 209). Progesteron može utjecati na citotoksičnost stanica NK putem PIBF (od engl. Progesteron induced blocking factor) (210) i podupirati angiogenezu (79).

1.5.3.2. Decidualne stanice NK

Decidualne stanice NK su dobro istražena populacija stanica kako u ljudi tako i u miša. U ljudi oko 70% decidualnih limfocita predstavljaju stanice NK specifičnog fenotipa CD56^{bright}CD16⁻. Ove stanice nalikuju CD56^{bright}CD16⁻ stanicama NK periferne krvi po izraženosti ova dva biljega i izraženosti visoke razine CD94/NKG2. Međutim, decidualne stanice NK nalikuju i CD56^{dim}CD16⁺ stanicama s obzirom na izraženosti KIR molekula i granuliranom sadržaju u stanici (198; 211) te se razlikuju od onih periferne krvi u fenotipu i u funkciji. (205) Aktivacijski receptor CD160 različito je izražen na stanicama NK periferne krvi i u decidui. Izražen je na većini CD56^{dim} stanica NK periferne krvi dok samo mali broj decidualnih stanica NK, i to one koje su CD56^{dim}, izražavaju CD160 koji je biljeg citotoksičnosti (212). Kako samo

mali broj decidualnih stanica NK izražava ovaj receptor, pretpostavlja se da glavna funkcija decidualnih stanica NK nije ubijanje ciljnih stanica (213). Međutim, aktivacija CD160 u stanicama NK periferne krvi dovodi do pojačanog lučenja IL-6, TNF- α i obilnog stvaranja IFN- γ (213). Ako se slični čimbenici stvaraju u CD160⁺ decidualnim stanicama NK nakon poticanja pomoću HLA-C koji je izražen na stanicama izvanresičastog trofoblasta, ovi citokini bi mogli imati važnu funkciju kao što je npr. lučenje IFN- γ koji je važan pri pregradnji krvnih žila (214). Decidualne i stanice NK periferne krvi izražavaju različite kemokinske receptore. Decidualne CD56⁺^{bright}CD16⁻ stanice izražavaju CXCR4 čiji je specifični ligand CXCL12 prisutan na površini prodirućeg izvanresičastog trofoblasta (197). CD16⁻ stanice NK periferne krvi izražavaju CXCR4 znatno više nego CD16⁺ stanice NK periferne krvi tako da je moguće da trofoblastne stanice privlače CD16⁻ stanice NK periferne krvi u deciduu lučenjem CXCL12 (197; 215). Biljege CD9 i CD151 izražavaju isključivo decidualne stanice NK dok su granzim A, kao i NKG2C i NKG2E pojačano izraženi na ovim stanicama. Decidualne stanice NK izražavaju NKp46, NKp44, NKp30, visoku razinu CXCR3 i srednju razinu CXCR4, izražavaju i CD69, a ne izražavaju L-selektin (216). Razlike u izražaju površinskih biljega i adhezijskih molekula decidualnih stanica NK i stanica NK periferne krvi prilazane su na Slici 7.



Slika 7. Razlike između stanica NK periferne krvi i decidue na temelju izražaja površinskih biljega i adhezijskih molekula. Prilagođeno iz Manaster I, Placenta 2008; 22:60-66

Decidualne stanice NK stvaraju veliki broj citokina kao što su MIP-1, GM-CSF i CSF-1 i to u većoj količini nego stanice NK periferne krvi (38), a luče i citokine koje stanice NK periferne krvi ne luče u normalnim uvjetima, a to su LIF, angiopoetin-2, VEGF-C (217). Za razliku od stanica NK periferne krvi, svježe izolirane nestimulirane decidualne stanice NK luče velike količine citokina što upućuje da su ove stanice aktivirane „in situ“, a njihovo lučenje može se dalje povećati „in vitro“ pomoću IL-15 ili IL-18 (60). Ovi citokini mogli bi sudjelovati u nadziranju prodiranja izvanresičastog trofoblasta pomoću necitotoksičnih mehanizama (214). Receptori za GM-CSF, CSF-1, IFN- γ i TNF- α su nađeni na humanim trofoblastnim stanicama (218). Međutim, decidualne stanice NK su prisutne i kod vrsta za koje nije osobitost prodiranja trofoblasta u maternicu. Stanice NK bi mogle sudjelovati i u promjeni aktivnosti decidualnih dendritičkih stanica i limfocita T (219). Aktivirane stanice NK mogu utjecati na decidualne dendritičke stanice da potiču protu-upalni imunološki odgovor (220). I još jedna moguća funkcija decidualnih stanica NK je u obrani

fetusa od mogućih virusnih infekcija što je vjerojatno posredovano lučenjem velike količine IFN- γ koji ima antivirusna svojstva (221). Molekule HLA-C, HLA-E i HLA-G izražene na ekstraviloznom trofoblastu otporne su na učinke US (od engl. Unique short) proteina kojeg luči citomegalovirus, tako da bi u slučaju infekcije maternice s ovim virusom specifični decidualni NK receptori mogli i dalje stupati u međudjelovanje s HLA I molekulama i omogućiti primjereno lučenje citokina s protuvirusnim svojstvima (214, 222).

1.5.3.3. Receptori decidualnih stanica NK

Izvršna funkcija decidualnih stanica NK strogo je nadzirana inhibicijskim i aktivacijskim receptorima (223). S obzirom na građu NK receptori pripadaju u četiri glavne obitelji receptora: a) KIR, b) C tip lektinska obitelj (CD94/NKG), c) ILT, d) NCR (od engl. natural killer cytotoxicity receptors) (224). Receptor CD94/NKG2 se veže na neklasične HLA-E molekule (225). Receptor CD94/NKG2A prenosi inhibicijski signal i sprječava lizu stanica, a CD94/NKG2C je aktivacijski receptor. Dakle, ovi receptori su aktivacijski ili inhibicijski ovisno o citoplazmatskoj domeni. Aktivacijski receptori imaju kratki citoplazmatski nastavak koji je povezan sa signalnom molekulom DAP12 koja sadrži ITAM (od engl. Immunoreceptor-tyrosine based activation motifs) koji prenose pozitivan signal (226). Inhibicijski receptori imaju dugi citoplazmatski nastavak koji je povezan s ITIM-om (od engl. immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs) koji prenose negativne signale nakon vezanja za specifične ligande (224). Homodimer NKG2D je aktivacijski receptor koji pripada lektinskoj obitelji receptora, a povezan je s MICA i MICB kao i s ULBP (od engl UL-16 binding protein) (225,227).

Za stvaranje KIR odgovorno je deset gena (224). Izvanstanična domena može imati dvije (KIR2D) i tri (KIR3D) imunoglobulinu slične domene (224). KIR2D uglavnom prepoznaje HLA-C i razlikuje dva HLA-C alotipa koji se razlikuju na temelju dismorfizma $\alpha 1$ domene. Receptor KIR2DL ima dugi citoplazmatski nastavak i

povezan je s ITIM, dok je KIR2DS s kratkim citoplazmatskim nastavkom povezan s ITAM/DAP-12. Stanica NK istovremeno izražava dva ili više KIR i/ili CD94/NKG2 i ITL (226). Izražen je uvijek barem jedan inhibicijski receptor za vlastite HLA I molekule, ali i istovremeno mogu izražavati i KIR koji prepoznaju tuđe HLA molekule što je važno u reprodukciji koja je jedino fiziološko stanje u kojem stanice NK dolaze u dodir s tuđim HLA molekulama (223). Obitelj ILT čine barem osam članova koji imaju različiti broj imunoglobulinskih domena te mogu biti aktivacijski i inhibicijski (223). Receptor ILT se nalazi izražen na stanicama monocitne loze, limfocitima B, stanicama NK i T limfociti. Dva člana ILT obitelji (ILT2 i ILT4) vežu se na HLA I molekule, uključujući HLA-G. Aktivacijski receptori, NKp46, NKp44 i NKp30 pripadaju u NRC skupinu receptora (214). Zanimljivo je da su specifični ligandi za većinu decidualnih NK receptora izraženi na izvanresičastom trofoblastu i to HLA-C, HLA-E i HLA-G (223, 225, 226). Međutim, decidualne stanice NK ne pokazuju citolitičku aktivnost protiv trofoblastnih stanica, a njihova citotoksičnost je smanjena u odnosu na stanice NK periferne krvi, iako izražavaju citolitičke molekule kao što je perforin, granzim A i granzim B kao i nekoliko aktivacijskih receptora kao što su NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D i NKG2B (228). U „in vitro“ pokusima pokazano je da decidualne stanice NK ne mogu ubiti trofoblastne stanice ukoliko nisu aktivirane s IL -2 koji nije prisutan u normalnim trudnoćama (229). Nedostatak citolitičke aktivnosti stanica NK prema trofoblastnim stanicama može biti posljedica međudjelovanja između neklasičnih molekula HLA I (HLA-E i HLA-G i HLA-C) i inhibicijskih receptora izraženih na stanicama NK kao što je LIR-1, ILT2, KIR2DL4 i CD94/NKG2A iako KIR2DL4 može pokazivati i aktivacijsku funkciju (214). Vacca i suradnici (230) smatraju da je citolitička aktivnost stanica NK potisnuta 2B4 receptorom koji donosi inhibicijski signal što je sukladno s niskom ili odsutnom izraženosti bjelančevina koje su povezane s signalnim aktivacijskim molekulama na limfocitima. Nedostatak citotoksičnosti kod decidualnih stanica NK može biti posljedica i njihove nemogućnosti da stvaraju zrele aktivacijske sinapse (231).

Decidualne stanice NK ne mogu polarizirati mikrotubule u organizacijske centre i granule koje sadrže perforin u sinapse (231). Nemogućnost decidualnih stanica NK da ubiju trofoblastne stanice moglo bi biti posljedica izražaja aktivne forme X-vezanog inhibitora apoptoze (XIAP) u trofoblastnim stanicama prvog tromjesečja trudnoće (186). Ovaj inhibitor kaspaza smanjuje učinkovitost Fas apoptotičke kaskade u trofoblastu rane trudnoće. Međudjelovanje decidualnih stanica NK s okolnim stanicama koje pripadaju ili ne pripadaju imunološkom sustavu doprinosi njihovoj inhibiciji i sposobnosti da oštete okolno tkivo ubijajući stanice fetalnog podrijetla (214).

1.5.3.4. Uloga decidualnih stanica NK na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Decidualni mikrookoliš potiskuje citotoksičnu funkciju stanica NK, ali i potiče njihovu višestruko korisnu funkciju. Zapravo, Croy i suradnici (116) su pokazali da uklanjanje decidualnih stanica NK u miša dovodi do poremećaja mjesta implantacije kao i neodgovarajuće pregradnje spiralnih arterija, a funkcija decidualnih stanica NK na mjestu implantacije posredovana je lučenjem IFN- γ koji vjerojatno određuje promjer lumena krvnih žila tijekom decidualizacije. Stoga su decidualne stanice NK ključne za normalnu preinaku i razvoj krvnih žila u decidui koja je nužna za razvoj normalne trudnoće. Funkcija decidualnih stanica NK upućuje na to da je aktivacija, a ne inhibicija ovih stanica nužna kako bi mogle obaviti svoju korisnu ulogu na spoju majčinih i fetalnih tkiva (205). Moffet i suradnici (38) upućuju da međudjelovanje između KIR na decidualnim stanicama NK i HLA-C na izvanresičastom trofoblastu, koji dovodi do jakog potiskivanja funkcije stanica NK, povećava opasnost razvoja preeklampsije. Aktivacija stanica NK ostvarena vezanjem KIR s HLA-C uzrokuje bolje prodiranje stanica trofoblasta (211).

Decidualne stanice NK koje izražavaju aktivacijski receptor KIR2DS4 stvaraju veću količinu IL-10, VEGF i PLGF nego klonovi koji izražavaju inhibicijske receptore kao što je KIR2DL1 (214). To znači da aktivacija decidualnih stanica NK smanjuje

opasnost od razvoja preeklampsije stvaranjem dovoljne količine čimbenika rasta i kemokina koji doprinose prodiranju trofoblastičnih stanica i pregradnji krvnih žila (232). Istraživanja kod ponavljajućih spontanih pobačaja pokazala su da ne postoji razlika u ukupnom broju stanica NK u decidui normalne i patološke trudnoće, međutim, u decidui patoloških trudnoća veći je udio $CD56^{+dim}CD16^{+}$ stanica koje imaju ograničen raspon inhibicijskih receptora. Iz navedenog se može zaključiti da međudjelovanje između majčinih KIR izraženih na površini decidualnih stanica NK i HLA-C molekula koje potječu od oca imaju značajnu ulogu u regulaciji razvoja i vaskularizacije posteljice (205).

Decidualne stanice NK predstavljaju specifičnu skupinu stanica koja je različita od stanica NK periferne krvi trudnica. Masivna mobilizacija ovih stanica na mjesto implantacije i njihovo obilje u decidui bazalis tijekom prvog i drugog tromjesečja trudnoće upućuje na njihovu važnost, a njihov fenotip se može usporediti s njihovom specifičnom funkcijom.

1.6. Citotoksični mehanizmi na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Stanice NK i limfociti T predstavljaju glavne izvršne stanice imunološkog sustava u reakcijama stanicama posredovane citotoksičnosti koje se odvijaju kroz dva osnovna mehanizma, a to su citotoksičnost posredovana otpuštanjem sadržaja iz citotoksičkih zrnaca te citotoksičnost posredovana smrtonosnim receptorima (233). S obzirom na brzinu citotoksične aktivnosti razlikuju se brzi citotoksični mehanizmi posredovani perforinom i smrtonosnim receptorima (FasL) te dugoročni mehanizmi posredovani čimbenikom nekroze tumora α (TNF α) i molekulom TWEAK (od engl. TNF-like weak inducer of apoptosis), te granulizin i TRAIL (od engl. TNF-related apoptosis inducing ligand) (234, 235, 236).

1.6.1. Perforin

Podak i suradnici prvi put su izdvojili perforin iz limfocita T (237). Njegova sinteza počinje stvaranjem neaktivnog oblika veličine 70 kDa koja se potom cijepa na C terminalnom kraju pri čemu nastaje aktivna forma veličine 60 kDa (238). Ova forma sastoji se od 534 aminokiselina, koja je u središnjem dijelu dužine 300 aminokiselina i pokazuje homologiju s C9 komponentom komplementa te je uključena molekule u formiranje pora (238). Nakon lučenja u međustanični prostor, perforin se veže i umeće u fosfolipidni dvosloj stanične membrane ciljne stanice te polimerizira pri čemu stvara pore promjera 16 nm koje uzrokuju staničnu smrt procesom nekroze dovodeći do osmotske nestabilnosti i lize ciljne stanice. Iako perforin uništava ciljnu stanicu nije štetan za stanicu u kojoj se sintetizira. Razina kalcija u zrnima koja sadržavaju perforin je vjerojatno niska budući da je perforin unutar zrnaca u obliku monomera (239). Tek nakon sekrecije dolazi do porasta pH i porasta koncentracije kalcija što omogućuje aktivaciju perforina i uništenje ciljne stanice i stanice u kojoj je stvaran (239). Kroz pore je omogućen ulazak drugih sastojaka citotoksičkih zrnaca, prije svega granzima B, koji dovodi do apoptoze ciljne stanice (240). Postoje barem tri vrste granzima (A, B i H) koji se nalaze zajedno s perforinom u citolitičkim zrnima te se luče putem egzocitoze u smjeru ciljne stanice (239). Unutar ciljne stanice granzim uzrokuje cijepanje DNA dovodeći do apoptoze. Ulazak granzima u ciljnu stanicu moguć je i bez prisustva perforina, a jedan od načina djelovanja je svakako putem manoza-6-fosfatnog receptora (241). Moguće je da je perforin nužan prije svega za oslobađanje granzima B iz endosomskog odjeljka, a ne samo u stvaranju pora na ciljnoj stanici (204).

1.6.2. Perforin na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Decidualne stanice NK sadrže brojna zrnca ispunjena citotoksičnim medijatorima koji sprječavaju pretjerani prodor trofoblasta, ali i omogućavaju opskrbu posteljice majčinom krvlju (233). Rukavina i suradnici (242). pokazali su da je sadržaj perforina u decidui veći nego u bilo kojim drugim fiziološkim i patološkim stanjima budući da više od 95% od svih decidualnih CD56⁺ stanica izražava perforin. Iako su citotoksične stanice u decidui spremne ubiti ciljne stanice, pod učinkovitim su nadzorom koji onemogućava njihovu aktivaciju koja bi mogla dovesti do prekida trudnoće. Nadzor stanica NK vrši se topljivim čimbenicima (IL-2, IL-12, IL-15 i IL-18) i progesteronom. Uloga perforina na spoju majčinih i fetalnih tkiva je obrana majke i fetusa od različitih mikroorganizama kao i uklanjanje odumrlih stanica zametka i stanica posteljice. King i suradnici (243) su „in vitro“ pokazali da nestimulirane svježe izdvojene stanice NK ne ubijaju trofoblastne stanice prvog tromjesečja trudnoće, a pokazuju citotoksičnost prema NK osjetljivim K562 humanim stanicama kronične leukemije. Kada su stanice NK stimulirane s IL-2 dobivaju LAK aktivnost (od engl. Lymphokine activated killing) i citotoksičnost prema trofoblastu kao i JEG-koriokarcinomskoj staničnoj liniji. Limfociti prvog tromjesečja trudnoće liziraju NK rezistentnu P815 mišju liniju (244).

Velika količina perforina u decidui vjerovatno služi zaštiti majke i fetusa od potencijalno štetnih bakterija. Ukoliko je zaštitna barijera narušena infektivnim uzročnikom ili abnormalnom imunološkom aktivacijom, brzi imunološki odgovor osigurava oslobađanje citotoksičnih medijatora kako bi zaštitili majku što može dovesti do gubitka fetusa ukoliko postoji potreba za jakim Th1 odgovorom. Čuvanje majčinog života je evolucijski izbor koji je presudan za održavanje vrste (245).

1.6.3. Fas Ligand

Fas je tip I transmembranske bjelančevine koji u izvanstaničnom dijelu sadrži tri cisteinom bogata ponavljajuća dijela koja služe kao vezno mjesto za različite ligande (246). Fas je izražen na velikom broju normalnih stanica uključujući limfocite T i B, jetrene stanice i epitelne stanice jajnika. FasL je tip II transmembranskog proteina, a njegova izraženost na stanicama udružena je s imunološki povlaštenim mjestima i preživljavanjem tumora (246). FasL je izražen na imunološki privilegiranim mjestima kao što je oko (247), maternica i posteljica (248). Neki tumori izražavaju FasL, vjerojatno kao način kojim izbjegavaju imunološki odgovor (249). Kada dođe do vezanja Fas i FasL, aktivira se kaskada koja dovodi do aktivacije unutarstanične domene smrti, DD (od engl. Death domain) koja aktivira nizvodne signalne puteve koji konačno vode aktivaciji kaspaze-3 koja uzrokuje razgradnju bjelančevina i staničnu smrt (250). Nedostatak FasL udružen je s autoimunim nefritisom, uvećanjem limfnih čvorova, limfoproliferativnim bolestima, hipergamaglobulinemijom, dok nedostatak gena za Fas dovodi do sličnih poremećaja što ukazuje na ulogu međudjelovanja Fas i FasL u održavanju homeostaze limfnog tkiva (251).

1.6.4. Fas/Fas Ligand na spoju majčinih i fetalnih tkiva

FasL izražavaju stanice resičastog i izvanresičastog trofoblasta, intersticijskog trofoblasta te velike „gigantske“ trofoblastne stanice često s dvije jezgre i makrofagi iz fetalnih resica ili Hoffbauerove stanice (252, 253). FasL izražen je u endometriju žena koje nisu trudne kao u trudnih žena do 4 dana nakon čega je FasL izražen u decidui, oko mjesta implantacije (30). Tijekom 12. i 14. dana trudnoće FasL je prisutan na stanicama trofoblasta koje razdvajaju majčine prostore ispunjene krvlju i endotelne stanice zametka (252). Izraženost FasL najprije u maternici, a poslije na posteljici vjerojatno je mehanizam koji omogućava zaštitu zametka od aktiviranih stanica imunološkog sustava. FasL upravlja seljenjem Fas⁺ stanica na spoju majčinih i

fetalnih tkiva i osigurava mehanizam kojim stanice trofoblasta izbjegavaju majčin imunološki odgovor (233). FasL je pohranjen u unutarstaničnim zrnima limfocita T i stanica NK te izlazi na površinu stanice nakon njihove nespecifične aktivacije što dovodi do apoptoze Fas⁺ ciljnih stanica bez međusobnog dodira stanica (256). FasL također je izražen na trofoblastnim stanicama u resicama posteljice gdje vjerojatno nadzire rast posteljice. U decidui većina stanica koje podliježu apoptozi su majčini leukociti, dok stanice trofoblasta, posebice na mjestu najjačeg prodiranja nisu apoptotičke, iako mogu biti okružene stanicama koje podliježu apoptozi. Čini se da funkcija FasL ovisi o njegovom anatomskom smještaju. U resicama, FasL bi mogao biti uključen u rast posteljice, dok u decidui vjerojatno služi obrani od aktiviranih majčinih leukocita (233). Uloga Fas i FasL u fiziologiji trofoblasta znatno je složenija nego se prvotno smatralo budući da trofoblastne stanice osim FasL izražavaju i Fas molekulu, a trofoblast je zaštićen od stanicama posredovane smrti tijekom rane trudnoće jer izražavaju Fas receptore koji ne prenose signal u stanicu (233, 257, 258).

1.6.5. Nadziranje kratkoročnih citotoksičnih mehanizama na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Smatra se da citokini igraju ključnu ulogu u nadziranju izraženosti perforina i FasL. Poznato je da IL-2 povećava citotoksičnost limfocita T i stanica NK prema NK osjetljivim i rezistentnim stanicama (244) kao i prema citotrofoblastu, tumorima i virusima inficiranim stanicama. Humane stanice NK pod utjecajem IL-2 postaju LAK stanice koje su citotoksične prema stanicama trofoblasta kao i prema JEG koriokarcinomskoj staničnoj liniji (244). Citokin IL-2 povećava izraženost perforina i FasL na razini mRNA i bjelančevine u decidualnim limfocitima (259). Međutim IL-2 nije prisutan na spoju majčinih i fetalnih tkiva (259), iako su von Rango i suradnici (260) otkrili iznimno niske koncentracije IL-2 u decidualnom tkivu. Citokin IL-12, prisutan kod ljudi i miša na mjestu implantacije u niskim koncentracijama, uključen je u nadziranje prodiranja trofoblasta i pregradnju krvnih žila tijekom rane trudnoće

(261). Decidualni limfociti kao i limfociti periferne krvi stimulirani s IL-12 citotoksični su prema JEG-3 i JAR koriokarcinomskoj staničnoj liniji i prema stanicama trofoblasta. Limfociti periferne krvi trudnih žena stimulirani s IL-12 povećavaju izraženost perforina i povećavaju citotoksičnost posredovanu perforinom prema K562 staničnoj liniji (261). Citokin IL-15 povećava citotoksičnost limfocita periferne krvi posredovane perforinom, granzimima i IFN- γ (262). Nađen je u decidui na makrofagima, stromalnim stanicama, amnionu i korijonu (68), a njegovu izraženost nadziru prostanglandini i progesteron. Progesteron se veže na stromalne stanice koje izražavaju progesteronski receptor što dovodi do povećanog stvaranja PIBF koji onda ostvaruje svoj učinak na decidualne stanice, uključujući i makrofage (263). IL-18, koji je značajan u pregradnji krvnih žila tijekom rane trudnoće, povećava citotoksičnost stanice NK i CD8⁺ T stanica povećanjem izraženosti perforina i FasL (264)

1.6.6. Uloga kratkoročnih citotoksičnih mehanizama na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Funkcija citotoksičnih molekula na spoju majčinih i fetalnih tkiva i dalje nije u potpunosti razjašnjena. Visoki citolitički potencijal stanica NK najvjerojatnije osigurava zaštitu majke i fetusa protiv različitih mikroorganizama, ali i dalje ne objašnjava potrebu za tolikim citotoksičnim potencijalom stanica NK tijekom trudnoće (245). Smatra se da perforin i FasL služe održavanju homeostaze decidualnih stanica NK (233). Miševi koji ne posjeduju gen za perforin imaju znatno veći broj stanica NK u decidui koje se nastavljaju umnažati i nakon što se broj stanica NK fiziološki počinje smanjivati tijekom proestrusa u normalnog miša (265). Kod miševa kojima nedostaje gen za FasL postoji izrazita infiltracija leukocitima i nekroza nakon 10 dana trudnoće. Stanice koje su prodirale kroz granicu posteljice bili su neutrofili i makrofagi što ukazuje na to da odsustvo FasL omogućava pretjeranu infiltraciju posteljice majčinim

fagocitima (248). Redundantni mehanizmi su od iznimne važnosti na spoju majčinih i fetalnih tkiva. Nedostatak samo jednog od ovih medijatora ne uzrokuje neplodnost u miševa dok su mišice kojima nedostaju geni za oba citolitička puta neplodne te boluju od teške upale gušterače, maternice i jajovoda te neplodnosti (266). Stanice NK i limfociti T kojima nedostaju geni za perforin i FasL nisu sposobne ukloniti antigen predodne stanice što dovodi do ponavljanog stimuliranja i klonskog umnažanja citotoksičnih limfocita T i stanica koje predodavaju antigen što dovodi do pro-upalnog Th-1 staničnog odgovora (266). Th1 citokini povećavaju izraženost Fas molekule na trofoblastnim stanicama što ih čini podložnim apoptozi posredovanoj aktiviranim majčinih limfocitima (267). Tako perforin i FasL predstavljaju dva glavna citolitička puta koji pod utjecajem lokalnih citokina i hormona djeluju na stupanj aktivacije decidualnih stanica NK i time sudjeluju u podešavanju imunološkog odgovora na spoju majčinih i fetalnih tkiva (233).

1.6.7. TRAIL na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Bjelančevina TRAIL koja pripada obitelji TNF, a strukturno i funkcionalno vrlo je slična FasL bjelančevini (268). TRAIL i FasL međusobno surađuju u ograničavanju klonskog umnažanja limfocita nakon aktivacije i koriste zajedničke signalne puteve koji dovode do apoptoze stanica (269). Unutar sustava TRAIL/TRAIL-receptora (R) nadziranje apoptoze ovisi o različitoj izraženosti pojedinih receptora za TRAIL, kao što su DR4 (TRAIL-R1) i DR5 (TRAIL-R2) koji prenose signal za apoptozu te DcR1 (TRAIL-R3) i DcR2 (TRAIL-R4) kojima nedostaje funkcionalna smrtonosna domena i djeluju kao receptori mamilice (270). Apoptotska signalna kaskada slična je kao i za Fas/FasL, vodi aktivaciji kaspaze-8 i neizbježne smrti stanice uslijed cjepanja DNA. Prava uloga TRAIL molekule nije u potpunosti poznata, ali se smatra da ima važnu ulogu u djelovanju protiv tumora i virusom inficiranih stanica (80). TRAIL-R su izraženi u različitim tkivima, a analiza Northern blot-om pokazala je prisustvo svih

četiriju vrsta u humanoj posteljici (271). TRAIL je izražen na stanicama sinciciotrofoblasta te vjerojatno, zajedno s molekulom FasL sudjeluje u održanju imunoprivilegiranih uvjeta na spoju majčinih i fetalnih tkiva. Sinciciotrofoblast sadrži najviše TRAIL molekula koje zajedno s FasL ograničava umnažanje limfocita (234, 271). Citokin IFN- γ povećava izraženost medijatora TRAIL na aktiviranim limfocitima i stanicama trofoblasta (271). Makrofagi su druga populacija stanica koja izražava TRAIL (271). Uloga TRAIL molekule na viloznim makrofagima nije poznata, međutim moguće je da ove stanice, kojima je glavna uloga da fagocitiraju, luče citokine i sprječavaju prijenos neželjenih tvari u fetus, koriste TRAIL kako bi doprinjeli oblikovanju posteljice i zaštilili majku i zametak od razvoja neoplastičnih stanica (271). Majčine decidualne stanice također su TRAIL pozitivne. Čini se nerazumno da ove stanice ubijaju trofoblastne stanice, a malo je dokaza koji govore u prilog smrti stanica trofoblasta posredovane ovim mehanizmom. Stoga se smatra da je moguća uloga ovog medijatora da uništi neoplastične stanice koje nastaju u dinamičnoj situaciji rasta i proliferacije kakvo je prisutvu u trudnoći.

1.7. Kemokini

Kemokini su velika obitelj malih kemotaktičnih citokina koji imaju značajnu ulogu u privlačenju i aktivaciji leukocita (272). Imaju brzo lokalno djelovanje putem receptora udruženih s G proteinom. Postoji više od 50 kemokina, a dijele se u četiri skupine ovisno o građi aminoterminalnog cisteinskog kraja molekule i to u CC, C, CXC i CX₃C kemokine. Postoji znatno preklapanje u djelovanju kemokina većinom zbog ograničenog broja kemokinskih receptora u odnosu na broj kemokinskih liganada (95). Kemokini se luče u odgovoru na upalni poticaj, brzo djeluju i brzo se razgrađuju, ali mogu biti i konstitucijski izraženi u svrhu tkivne homeostaze i imunološkog nadzora. Proces kemotaksije nije ovisan samo o koncentraciji kemokina nego i o prisustvu i aktivnosti proteolitičkih enzima kao što su matriks metaloproteinaze što omogućuje da kemokinski mikrookoliš bude strogo kontroliran.

Pretjerana ili nekontrolirana izraženost kemokina može dovesti do neprimjerenog kretanja i aktivacije leukocita u tkiva (272).

1.7.1. Izražaj kemokina na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Različiti kemokini su izraženi u endometriju. Stanice koje luče kemokine smještene su pretežno uz glandularni i luminalni epitel, leukocite i decidualiziranu stromu, a u nekim slučajevima i uz majčine krvne žile (199). Tijekom rane faze implantacije i placentacije kemokini su odgovorni za uspostavljanje jedinstvenog okoliša privlačeći leukocite koji su nužni za uspješnu trudnoću, makrofage i stanice NK. Cijela paleta kemokina i njihovih receptora izražena je u epitelu endometrija, decidui i invazivnom citotrofoblastu tijekom implantacije embrija (198). Prema dosadašnjim istraživanjima kemokini nisu nađeni na blastocisti u periimplantacijskom razdoblju, kao ni u mediju u kojem je blastocista kultivirana (273), ali su nađeni receptori CCR2B i CCR5 na unutrašnjem sloju stanica blastociste i na vanjskom sloju trofoblasta (273). Na epitelu maternice tijekom sredine sekrecijske faze intenzivno je izražen fraktalkin, CCL4, CCL8, CCL11, CCL-14, CCL16, CCL21, CCL22 (274, 275, 276) za koje se smatra da imaju značajnu ulogu u događajima koji prethode implantaciji. Kemokinski receptori (CXCR1, CXCR4, CCR5 i CCR2B) su također nađeni na epitelnim stanicama maternice tijekom faze prijemljivosti endometrija tako da se može pretpostaviti da kemokini koji se oslobađaju u lumen maternice ili na površini luminalnog epitela igraju značajnu ulogu u priljubljivanju i pričvršćivanju blastociste tijekom implantacije (198). Kemokini i njihovi receptori utvrđeni su na citotrofoblastu tijekom prvog tromjesečja trudnoće, a uključuju CXCR1, SDF-1 (od engl. Stromal derived factor) i MIP-1 α (277, 278) i njihove receptore CCR1, CCR2B, CCR5, CXCR2B i CXCR1 (273, 277). Kemokinski receptori (CXCR1, CCR1, 2 i 3) su također nađeni na endovaskularnom ekstraviloznom trofoblastu (279). Nadalje, unutar resica gotovo svi kemokini su izraženi na fibroblastima ili makrofagima, a citotrofoblast izražava široku paletu kemokinskih receptora što znači da su stanice

citotrofoblasta spremne odgovoriti na kemokinske signale na spoju majčinih i fetalnih tkiva (280). U decidui je prisutan veliki broj kemokina i njihovih receptora koji mogu privući kako pro-upalne tako i protu-upalne stanice. Većina kemokina koje luči decidualizirana stroma endometrija, kao što je MDC, MCP-3, fraktalkine, 6Ckine, MIP-1 β snažno potiču kemotaksiju kako makrofaga tako i stanica NK (276). Prekursori decidualnih stanica NK u perifernoj krvi (CD56⁺CD16⁻) izražavaju receptore i snažno odgovaraju na 6Ckine i nešto manje na MIP-1 β i MCP-4 (281, 282). Tijekom prvog tromjesečja trudnoće kemokini su vjerojatno odgovorni za putovanje leukocita u decidui, a kemokini koji su odgovorni za to su GCP-2 (od engl. Granulocyte chemotactic protein), IP-10 (od engl. Inositol phosphate-10), BRACK, MCP-1, MIP-1 α (273, 277, 278). Tijekom implantacije i razvoja posteljice kemokini su odgovorni za uspostavljanje jedinstvenog imunološkog okoliša pomoću privlačenja određenih leukocita prisutnih tijekom trudnoće, prije svega makrofaga i stanica NK. Tako CCL2 luče endometrijalne epitelne stanice kako u lumen maternice tako i bazalno u podliježeću stromu i vjerojatno posreduje u privlačenju makrofaga u deciduu, a mogao bi imati i učinak i na blastocistu u periimplantacijskom razdoblju budući da sama blastocista izražava receptor za CCL2 (CCR2). Pro-upalni citokini TNF- α i IL-1 β potiču stvaranje CCL2, a povišena razina ovog kemokina u endometriju dovodi do nekontroliranog privlačenja makrofaga što može dovesti do poremećaja u prodiranju trofoblasta u krvne žile. Promjene u izraženosti kemokina i pro-upalnih medijatora na mjestu implantacije mogu dovesti do ranih poremećaja u posteljici što može dovesti i do preeklampsije (272, 279).

1.7.2. Kemokinski ligand 22 (CCL22) na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Kemokin koji potječe od makrofaga (MDC od engl. macrophage derived chemokine) ili CCL22 pripada obitelji CC kemokina. Stvaraju ga prije svega makrofagi i dendritičke stanice nakon stimulacije s patogenima ili anti CD40 protuutijelom. Th2 citokini, kao što su IL-4 i IL-5, povećavaju njegovo lučenje dok ga Th1 citokini smanjuju. Kemokin CCL22 dovodi do seljenja dendritičkih i Th2 stanica, a povećan je u bolestima koje su udružene s Th2 imunološkim odgovorom kao što je atopijski dermatitis. CCL22 igra značajnu ulogu u privlačenju Th2 stanica na mjesto upale i u nadziranju Th2 imunološkog odgovora (283). CCL22 nalazi se izražen u endometriju tijekom sredine sekrecijske faze kao i tijekom rane trudnoće, a luči se većinom u decidui (276).

1.7.3. Kemokinski ligand 3 (CCL3) na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Kemokin CCL3 ili MIP-1 α luče makrofagi nakon stimulacije s bakterijskim citokinima (284). Aktivira granulocite što dovodi do akutne upale posredovane neutrofilima. Potiče stvaranje i oslobađanje drugih pro-upalnih citokina kao što je IL-1, IL-6 i TNF- α iz fibroblasta i makrofaga (284). Utječe na funkciju stanica NK mnogostrukim mehanizmima. CCL3 privlači stanice NK, povećava njihovo umnažanje i citotoksičnost, vjerojatno povećanjem oslobađanja perforina, te povećava lučenje drugih pro-upalnih kemokina iz stanicama NK (285). Povećana izraženost ovog kemokina mogla bi biti udružena s povećanjem citotoksičnosti decidualnih stanica NK, što bi moglo nepovoljno utjecati na ishod trudnoće. Pokazano je ranije prisustvo ovog kemokina u endometriju (286), iako Johnes i sur. pomoću RT-PCR-a nisu uspjeli dokazati njegovo prisustvo tijekom menstrualnog ciklusa (276).

1.7.4. Kemokinski ligand 17 (CCL17) na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Kemokinski receptor CCR4 izražen je većinom na površini Th2 stanica, a njegov ligand je CCL17 (TARC) koji ima značajnu ulogu u privlačenju Th2 stanica na mjesto imunološkog odgovora (287). Tsuda i sur. su pokazali da je TARC, kao Th2 kemokin, prisutan tijekom rane trudnoće te da ga luče pretežno stanice trofoblasta, epitelne stanice maternice i endometrijalne žlijezde te posreduje u infiltraciji CCR4+ T stanica na spoju majčinih i fetalnih tkiva što je važno u održavanju trudnoće (287).

1.8. Citokini na spoju majčinih i fetalnih tkiva

Citokini su regulacijski peptidi ili glikoproteini koje mogu stvarati gotovo sve stanice u tijelu koje posjeduju jezgru (80). Imaju pleotropni učinak i nadziru hematopoetske, endokrine, neuralne i brojne druge stanice (80), a djeluju kao posrednici između stanica i/ili unutar stanica lokalno u tkivu, a samo se rijetko otpuštaju u cirkulaciju i djeluju kao endokrini medijatori (288, 289). CD4+ limfociti T igraju središnju ulogu u imunološkom sustavu jer stvaraju citokine i nadziru različite imunološke funkcije. Mogu se klasificirati na limfocite Th1 i Th2 T s obzirom na stvaranje citokina (290). Th1 stanice koje stvaraju pro-upalne citokine kao što su IL-2, TNF- α i IFN- γ koji su uključeni u reakcije odgođene preosjetljivosti te su povezani s funkcijom citotoksičnih limfocita T (80). Th2 stanice stvaraju IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 koji su uključeni u imunološki odgovor posredovan protutijelima. Prevlad Th2 citokina smatra se presudnim za održavanje humane trudnoće (291). Th2 citokini, koje stvara trofoblast i druge stanice, nadziru funkcije majčinog endokrinog sustava i trofoblasta (292).

Citokine stvaraju limfociti nakon njihove aktivacije putem CD3-TCR kompleksa ili citokin-citokin receptorskog signala. Naivni limfociti T stvaraju isključivo IL-2, dok memorijski luče citokine kao što su IL-3, IL-4, IFN- γ i IL-6 (293). Limfociti prisutni u decidui rane trudnoće većinom su memorijski limfociti (294), te lokalno luče velike količine citokina.

Citokini IL-4 i IL-10 potiču diferencijaciju Th0 stanica u Th2 stanice (290), a, trofoblast luči IL-4 i IL-10 koji potiču Th-2 stanice (295). Stanice trofoblasta imaju resice i sadržavaju mRNA za IL-10 (94), što bi moglo objasniti prevlast Th2 stanica u decidui. G-CSF, koji se nalazi u velikoj količini u posteljici i decidui (296) također potiče Th2 limfocite (297). Progesteron je hormon koji se nakuplja za vrijeme trudnoće i presudan je za održavanje trudnoće. Kad se progesteron oslobodi iz žutog tijela nakon ovulacije, priprema maternicu za prihvata i razvoj oplođene jajne stanice diferencijacijom endometrija iz proliferacijske faze u sekrecijsku tj. deciduu. U međuvremenu Th1/Th2 omjer značajno pada što pogoduje (177) razvoju majčino-fetalne jedinice, što bi moglo biti posljedica djelovanja progesterona koji uzrokuje konverziju Th0 stanica u Th2 stanice. Decidualni limfociti T luče više IL-4 i LIF pod utjecajem progesterona nego klonovi limfocita periferne krvi istih žena (298). Citokin IL-15 sudjeluje u različitim funkcijama u prirođenoj i stečenoj imunosti, uključujući razvoj, aktivaciju, udomljavanje i preživljavanje izvršnih stanica, posebice stanica NK, NKT i CD8⁺ limfocita T (299), a stvaraju ga monociti, makrofagi, stromalne stanice koštane srži i epitelne stanice timusa kao i epitelne stanice u bubregu, koži i probavnom traktu (299). IL-15 utječe na citotoksičnost i umnažanje decidualnih stanica NK (Verma et al., 2000). Jedini čimbenik za kojeg je poznato da izaziva slične učinke je IL-2 (152). S obzirom na to da IL-2 nije dokazan nigdje na spoju majčinih i fetalnih tkiva, čini se da IL-15 ostvaruje značajni učinak u nadzoru stanica NK "in vivo". Dokazan je u endometriju žena koje nisu trudne, decidui i posteljici na razini proteina i mRNA. (300). S obzirom na to da su na stanicama NK prisutne sve tri komponente IL-15 receptora, smatra se da su stanice NK sposobne odgovoriti na stimulaciju IL-15 (68). Citokin IL-15 utječe na umnažanje decidualnih CD56⁺ stanica NK i to na način ovisan o dozi te utječe i na citolitičku aktivnost stanica NK protiv NK osjetljivih staničnih linija kao što je K562. Interleukin-15 također potiče citolitičku aktivnost decidualnih stanica NK protiv koriokarcinomske linije JEG-3, ali ne pojačava tu aktivnost protiv izoliranih stanica trofoblasta (68).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom polazi od pretpostavke da je MUC1 prirodni ligand za endocitozne receptore koji sadržavaju regije za vezanje ugljikohidrata, a izraženi su na decidualnim makrofagima. Tim putem bi MUC1 mogao poticati alternativnu aktivaciju makrofaga s posljedičnim izražavanjem biljega specifičnih za alternativnu aktivaciju i lučenjem protu-upalnih i tolerogenih cito/kemokina. MUC1 stimulirani makrofagi mogli bi nadalje poticati tolerogene mehanizme u decidualnom tkivu tijekom međudjelovanja s limfocitima T i stanicama NK, što uključuje usmjeravanje procesa pregradnje decidualnog tkiva na način nadziranja brojnosti i aktivacije decidualnih imunokompetentnih stanica. Da bi provjerili našu hipotezu ciljevi doktorske disertacije su:

1. Odrediti fenotipske razlike između decidualnih makrofaga i decidualnih dendritičkih stanica obilježavanjem površinskih CD14, CD1a i CD83 biljega

2. Istražiti vrstu aktivacije decidualnih CD14⁺ makrofaga

- obilježavanjem površinskih aktivacijskih biljega CD16, receptora mamilice CD163, receptora za endocitozu CD206 i CD209, kemokinskih receptora CCR5 i CCR7, te rezultate usporediti s monocitima periferne krvi
- utvrđivanjem unutarstaničnog stvaranja protu-upalnih cito/kemokina IL-4, CCL17 i CCL22 te pro-upalnih IFN- γ i CCL3
- analizom lučenja pro-upalnog CXCL10 i protu-upalnog CCL17 kemokina
- istraživanjem sposobnosti odgovora decidualnih makrofaga na stimulaciju s lipopolisaharidom u vidu testiranja izražaja CD206, internalizacije FITC-dextrana i unutarstaničnog stvaranja IFN- γ

3. Ispitati specifičnost vezanja MUC1 za decidualne makrofage

- Analizirat ćemo postojanje kompeticije između protutijela koja se specifično vežu za regiju za prepoznavanje ugljikohidrata na endocitoznom receptoru CD206 i MUC1. Primordijalni ligand za regiju za prepoznavanje ugljikohidrata, manan, služiti će kao pozitivna kontrola

- Analizirat ćemo postojanje kompeticije između MUC1 i FITC-dextrana za koji se zna da se internalizira putem regije za prepoznavanje ugljikohidrata. Manan će se koristiti kao pozitivna kontrola

4. Istražiti utjecaj MUC1 na decidualne makrofage

- Istražit ćemo izražaj površinskih biljega CD80, CD83, D6 i IL-1RII u decidualnim makrofagima nakon kultiviranja s MUC1 u usporedbi sa stanicama koje su kultivirane samo u mediju
- Istražiti ćemo unutarstanično stvaranje IL-15, IL-4, IL-10, IL-18 i IFN- γ u makrofagima nakon kultiviranja s MUC 1 u usporedbi sa stanicama koje su kultivirane samo u mediju

5. Razraditi protokol za pročišćavanje makrofaga iz decidualnog tkiva prvog tromjesečja zdrave trudnoće magnetskom separacijom stanica

6. Testirat ćemo utjecaj decidualnih makrofaga na funkciju autolognih decidualnih stanica NK u smislu utjecaja na proliferaciju, stvaranje citolitičkih medijatora (perforina, Fas liganda i TRAIL-a), citokina (IL-4 i IFN- γ) i kemokina (CCL3, CCL17 i CCL22).

7. Ispitat ćemo uzajamne reakcije citotoksičnosti između decidualnih makrofaga i stanica NK

- Utvrdit ćemo izražaj NK staničnih receptora NKp30, NKp44, NKp46, CD94, NKG2A, NKG2C i NKG2D na decidualnim stanicama NK
- Utvrditi stupanj citotoksičnosti decidualnih stanica NK prema decidualnim makrofagima
- Utvrditi koji aktivacijski receptori sudjeluju u toj interakciji
- Utvrditi moguće medijatore citotoksičnosti koji sudjeluju u toj interakciji

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Aceton, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Destilirana ili deiodizirana voda, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Entellan, Merck Whitehouse Station, NJ, SAD

Etilni alkohol, Kemig, Sesvete-Soblinec, Zagreb, Hrvatska

Forbol miristat acetat, Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, MO, SAD

Glukoza, Sigma-Aldrich Chemi, St Louis, MO, SAD

Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma-Aldrich Chemi, St Louis, MO, SAD

Hematoksilin, Gill III, Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, MO, SAD

Heparin injekcije, Belupo Koprivnica, Hrvatska

Hepes, Serva, Heidelberg, Njemačka

Humani AB serum (dobrovoljni davaoc krvi, Zavod za transfuziologiju KBC Rijeka, Hrvatska)

Ionicin Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, MO, SAD

Kalcijev klorid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijev hidrogenkarbonat, Sigma-Aldrich Chemi, St Louis, MO, SAD

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kolagenaza tipa IV, Sigma, Pool, Dorset, UK

L-glutamin, Gibco, Gaithersburg, MD, SAD

Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS, Norveška

Magnezijev klorid heksahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Monenzim Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, MO, SAD

Natrijev acetat trihidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrijev azid, Sigma-Aldrich Chemi, St Louis, MO, SAD

Natrijev dihidrogen fosfat-2-hidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Paraformaldehid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Paraplast, Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka

Penicilin-Streptomycin, Gibco, Gaithersburg, MD, SAD

Saponin, Sigma, Poole, Dorset, UK

Teleći fetalni serum (FCS), Gibco Gaithersburg, MD, SAD

Tissue Clear (Tvar za uklanjanje parafina na bazi ksilola) Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Nizozemska

Tripansko modriilo, Serva, Heidelberg, Njemačka

Tris base, Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, MO, SAD

Tween 20, Sigma, München, Njemačka

Vodikov peroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.1.2. Mediji i puferi

1. Karbonatni pufer

[Na₂CO₃ (1.5 mM), NaHCO₃ (3.48 mM), pH 9.6.

2. Kompletan RPMI medij za kulturu stanica (10% RPMI),

RPMI obogaćen s L-glutamatom (2 mM), penicilinom (1x10⁻⁵U/L, streptomycin sulfatom (0.05g/L), 10% telećim fetalnim serumom (FCS), GIBCO, Gaithersburg, MD, SAD

3. Medij za endocitozu

Otopina A: MgCl₂6H₂O 0.5 mM, CaCl₂ 1.17 mM

Otopina B: NaCl 136.8 mM, Na₂HPO₄ 7.95 mM, KH₂PO₄ 1.46 mM

Otopina A i otopina B se pomiješaju u omjeru 1:1, i podesi pH 7.4.

4. Medij za ispiranje za metodu ELISA

0.05% Tween 20 u PBS, pH 7.2 - 7.4

5. Medij za protočni citometar- FACS (od engl. Fluorescence-activated cell sorter) medij

NaCl (8.12 g/L), KH₂PO₄ (0.26 g/L), Na₂HPO₄ (2.35 g/L), KCl (0.28 g/L), Na₂-EDTA (0.36 g/L), NaN₃ (0.1 g/L)

6. Otapalo za kemikalije za metodu ELISA

1% BSA5 in PBS, pH 7.2 - 7.4, 0.2 M, filtriran

7. Otopina limunske kiseline pH 6,0

Destilirana voda 1 l, monohidrat limunske kiseline 2,1 g/l, podesiti na pH 6,0 s NaOH. (2 M)

8. Otopina saponina

PBS 1 l, saponin 0,1%, serum goveđeg fetusa 2%, EDTA 1 mM.

9. Otopina trisma base pH 7,5 (TB)

Destilirana voda 1 l, trisma base 6 g/l, podesiti na pH 7,5 sa HCl (5M).

10. Paraformaldehid 4%, pH 7,4

PBS 1000 ml, paraformaldehid 40 g/l, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (NaH₂PO₄ x

2H₂O) 16,83 g/l, natrijev hidroksid (NaOH) 3,85 g/l, glukoza 5,4 g/l

11. PBS za metodu ELISA

NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na₂HPO₄ (8.1 mM), KH₂PO₄ (1.5 mM)], pH 7.2-7.4,
0.2 µm filtriran / 0.05% Tween 20

12. Puferirana otopina trisma base (TBS)

Otopina trisma base 900 ml, natrij klorida 8,1 g.

13. RPMI 1640, Gibco

14. Substrat – otopina u omjeru 1:1 obojenog reagensa A (H₂O₂) i obojenog reagensa B (Tetramethylbenzidine) R&D Systems Minneapolis, MN, SAD

3.1.3. Laboratorijsko posuđe

96-U rupična ploča TPP, Trasadingen, Švicarska

Anatomska pinceta, Neolab, Heildeberg, Njemačka

DAKO Pen, Glostrup, Njemačka

ELISA čitač, BMG labtech, Offenburg, Njemačka

Epruvete s okruglim dnom, sterilne 4 ml, Falcon, BD Bioscience, San Jose, CA, SAD

Epruvete s okruglim dnom, sterilne 5 ml, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Njemačka

Erlenmayerova tikvica 100 ml, Boral, Pula Hrvatska

Filter za vakuum filtraciju, Filter-max, PES 0, 22 µm, TPP, Trasadingen, Švicarska

Filterpapir Whatman, Maidstone, Kent ME, UK

Kazete za uklapanje tkiva u parafin Marienfeld, Lauda-Köningshofen, Njemačka

Kolumne za magnetsku separaciju MS i LS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Njemačka

Konične epruvete (kušalice), sterilne 50 ml, 15 ml TPP tissue culture, Trasadingen, Švicarska

Kutije za držanje predmetnih stakalaca s rezovima tkiva i mape, Medicinski fakultet, Rijeka

Mikrotube, Greiner, Frichenhausen, Njemačka

Najlonska mrežica 80 mm, PES 0, 22 µm, TPP, Trasadingen, Švicarska

Nastavci s filterima, Greiner, Frichenhausen, Njemačka

Neubauerova komorica za brojenje stanica, Marienfeld, Lauda-Köningshofen, Njemačka

Pasteurova pipeta, Kartell, Noviglio (MI), Italija

Plastična Petrijeva zdjelica, 60x15 mm, 96 x 21 mm, 146 x 21 mm, TPP, Trasadingen, Švicarska

Plastične pipete E20, E200, E 1000, Greiner, Frichenhausen, Njemačka

Plastični nastavci za pipete 10-1000 µl, Greiner, Frichenhausen, Njemačka

Plastični nastavci za pipete, 0-100 µl, Greiner, Frichenhausen, Njemačka

Ploče za kulturu stanica, TPP tissue culture, Trasadigen, Švicarska

Pokrovno stakalce, Tlos, Zagreb, Hrvatska

Silanizirana stakalca, Dako, Carpenteria, CA, Carpentia, SAD

Staklene posude za imunohistokemiju, Marienfeld, Lauda-Köningshofen, Njemačka

Staničevina, Copan, Zagreb, Hrvatska

Strugač stanica TPP, Trasadingen, Švicarska

Hystobond, adhezivna stakalca, Marienfeld, Lauda-Köningshofen, Njemačka

Škarice, Neolab, Heildeberg, Njemačka

Teflonom presvučeni magneti, Kartell, Noviglio (MI) Italija

Tubice za zamrzavanje, Greiner, Frichenhausen, Njemačka

3.1.4. Uređaji

Automatske pipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka

Automatske pipete, Gilson, Middleton, WI , SAD

Centrifuga Heraeus megafuge 1.0R, Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, SAD

Eppendorf stolna centrifuga, Eppendorf, Hamburg, Njemačka

Hladnjak -20, Bosch, Stuttgart, Njemačka

Hladnjak -80, Snijders Scientific, Tilburg, Nizozemska

Inkubator (Hera cell 150, Heraeus), Kendro, Langenselbold, Njemačka

Komora za rad u sterilnim uvjetima, Klima oprema, Samobor, Hrvatska

Magnetska mješalica, Neolab, Heildeberg, Njemačka

Mikrotom, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany

Mikrovalna peć, Gorenje, Ljubljana, Slovenija

Protočni citometar, FACS Calibur, Beckton-Dickinson, St. Jose, CA, SAD

Svjetlosni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka

Timer, Scientific Oregon, Oregon, SAD

Vaga, Mettler Toledo Inc, Polaris Parkway, Columbus, OH, SAD

VarioMacs magnetski separator, Milteny Biotech, Bergisch, Gladbach, Njemačka

Vodena kupelj, INKO, Vrapče, Hrvatska

Vortex, Asid

3.1.5. Protutijela

Tablica1. Protutijela korištena za istodobno određivanje površinskih i unutarstaničnih biljega metodom direktne i indirektne imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom

Primarno protutijelo	Flourocrom	klon (izotip)	Proizvođač	Upotrebljavane koncentracije
CD14	FITC, PE	M5E2 (mIgG2a)	BD Bioscience	20µl/10 ⁶ stanica
CD14	nekonjugirano	UCHM (IgG2a)	Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Rijeka	
Manozni receptor	nekonjugirano	PAM-1 (mIgG1)	Mario Negri, Institute Milan, Italy, Chieppa-Wechii	1µg/ 10 ⁶ stanica
CD209	PE	DCN46 (IgG2b)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CD1a	PE	HI149 (mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CD1a	nekonjugirano	OKT-1 (mIgG1)	Dep. of Immunology and Inflammation, Clinical Institute Humanitas, Rozzano, Milano, Italija	1µg/ 10 ⁶ stanica
CD83	FITC, PE	HB15e(mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CD80	PE	L307.4 (mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CD86	PE	FUN-1 (mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica

Primarno protutijelo	Flourocrom	klon (izotip)	Proizvođač	Upotrebljavane koncentracije
CD83	PE		BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
HLA-DR	PE	G46-6 (mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CD163	pročišćeno	GHI/61 (mIgG1)	BD Bioscience	1 µg/10 ⁶ stanica
CCR5	PE	2D7 (mIgG2a)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CCR7	PE	3D12 (ratIgG2a)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
IL-1 R type II	pročišćeno	32437 (mIgG2a)	R&D Systems	1 µg/10 ⁶ stanica
D6	PE	196124 (rat IgG2a)	R&D Systems	20 µl/10 ⁶ stanica
CD16	PE	3G8 (mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CD56	PE	B159 (mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
CD3	PE	SP34-2(m IgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
perforin	nekonjugirani	δG9 (mIgG2b)	Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski Fakultet, Rijeka	3 µg/10 ⁶ stanica
perforin	PE	δG9 (mIgG2b)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
Fas ligand	nekonjugirani	NOK-1 (mIgG1)	BD Bioscience	1 µg/10 ⁶ stanica
Fas ligand	PE	NOK-1 (mIgG1)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
TRAIL	nekonjugirani	RIK-2 (mIgG1)	BD Bioscience	0.5 µg/10 ⁶ stanica
IL-18	nekonjugirani	125-2H	MBL	0,5 µg/10 ⁶ stanica
IL-15	PE	34559 (mIgG1)	R&D Systems	10 µl/10 ⁶ stanica
IL-4	PE	8D4-8 (IgG1)	BD Bioscience	0.25 µg/10 ⁶ stanica

Primarno protutijelo	Flourocrom	klon (izotip)	Proizvođač	Upotrebljavane koncentracije
IFN- γ	PE	B27 (IgG1)	BD Bioscience	0.5 $\mu\text{g}/10^6$ stanica
IL-10	PE	JES319F1 (rat IgG2a)	BD Bioscience	20 $\mu\text{l}/10^6$ stanica
CCL3	PE	93342 (mIgG2b)	R&D Systems	20 $\mu\text{l}/10^6$ stanica
CCL17	PE	54015 (mIgG1)	R&D Systems	20 $\mu\text{l}/10^6$ stanica
Nkp46	PE	9E2/NKp46 (mIgG1)	BD Bioscience	20 $\mu\text{l}/10^6$ stanica
Nkp46	nekonjugirano	9E2/NKp46 (m IgG1)	BD Bioscience	0.5 mg/ 10^6 stanica
Nkp30	nekonjugirano	210845 (mIgG2A)	R&D Systems	25 $\mu\text{g}/10^6$ stanica
Nkp44	nekonjugirano	253415 (m IgG2A)	R&D Systems	25 $\mu\text{g}/10^6$ stanica
NKG2D	PE	1D11 (mIgG1)	BD Bioscience	0.2 mg/ 10^6 stanica
NKG2D	nekonjugirano	1D11 (mIgG1)	BD Bioscience	0.5 mg/ 10^6 stanica
NKG2A	PE	131411 (m IgG2A)	R&D Systems	20 $\mu\text{l}/10^6$ stanica
NKG2C	PE	Clone 134591 (m IgG1)	R&D Systems	20 $\mu\text{l}/10^6$ stanica
MICA/B	nekonjugirano	6D4	BD Bioscience	0.5 mg/ 10^6 stanica
Primarna protutijela konjugirana s magnetskim kuglicama				
CD1a microbeads		Mouse IgG1	Milteny, Biotec	20 $\mu\text{l}/10^7$ stanica
CD56 microbeads		Mouse IgG1	Milteny, Biotec	20 $\mu\text{l}/10^7$ stanica
CD14 microbeads		Mouse IgG2a	Milteny, Biotec	20 $\mu\text{l}/10^7$ stanica

Izotipske kontrole

IgG1	nekonjugirano	MOPC-21 (mouse)	ATCC cell line	1 µg/10 ⁶ stanica
IgG1	FITC, PE, PE-Cy5	MOPC-21 (mouse)	BD Biosciences	20 µl/10 ⁶ stanica
IgG2a	FITC, PE	G155-178 (mouse)	BD Biosciences	20 µl/10 ⁶ stanica
IgG2a	PE	R35-95 (rat)	BD Biosciences	20 µl/10 ⁶ stanica
IgG2b	PE	27-35 (mouse)	BD Bioscience	20 µl/10 ⁶ stanica
Sekundarna protutijela				
Goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3	FITC	Polyclonal (goat)	BD Bioscience	4 µl/10 ⁶ stanica

2. Humano CCL17/TARC DuoSet ELISA Development kit – Komercijalno dostupna protutijela i kemikalije za ELISA – esej (ELISA kits, R&D Systems, Minneapolis, MN)

Primarna protu CCL17 monoklonska protutijela (prah) u koncentraciji 360 g/mL otopljena su u 1 mL PBS-a pri čemu je radna koncentracija 2 mg/ml.

Biotinilirana kozja protu-humana CCL17 protutijela (prah) u koncentraciji 18 g/mL

otopljena su u 1.0 mL Reagent Diluenta pri čemu je radna koncentracija 100 ng/ml.

Standard koncentracije 110 ng/mL rekombinantnog human TARC otopljen je u 5 mL Reagent Diluenta. Preporuča se standard koncentracije 500 pg/mL.

Streptavidin-HRP 1.0 mL streptavidina konjugirano s horseradish-peroxidase.

3. CXC ligand 10 (CXCL10) ELISA kit, komercijalno dostupna protutijela i kemikalije za ELISA – esej , R&D Systems, Minneapolis, MN

Mišje protu-humano CXCL10 protutijelo koncentracije 360 g/mL otopljeno je u 1.0 mL of PBS. Radna koncentracija je 2.0 g/mL

Biotinilirana kozja protu-human CXCL10 koncentracije 9 g/mL otopljena su u 1.0 mL Reagent Diluenta. Radna koncentracija je 50 ng/mL.

Standard koncentracije 90 ng/mL rekombinantnog humanog IP-10 otopljen je u 5 mL Reagent Diluenta. Preporučen je standard koncentracije 2000 pg/mL Streptavidin-HRP 1.0 mL streptavidina konjugirano s horseradish-peroxidase.

4. PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma, München, Germany

Boja: PKH-26 crveno-narančasta fluorescentna lipofilna boja.

Otapalo: Diluent C.

5. CFSE za za test proliferacije Molecular Probes, Eugene, OR, USA

CFSE (od engl. 5(6) - karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estera

Kit sadrži:

-CellTrace™ CFSE, 50 µg liofiliziranog praha (Komponenta A)

- **DMSO**, 0,5 ml visokokvalitetnog dimetilsulfoksida (Komponenta B)

6. Kemikalije za imunohistologiju, DAKO, Carpenthia, CA, USA

EnVision™ G|2 Doublestain System, Rabbit/Mouse

(DAB+/Permanent Red)

- a) Otopina za blokiranje aktivnosti endogenih enzima koja sadrži 0.5% vodikov peroksid, detergente, inhibitore enzima i konzervans, pH 2.
- b) Polimer dekstrana konjugiran s horseradish peroxidase i imunoglobulinom, pohranjen je u Tris/HCl puferu koji sadrži stabilizirajuće bjelančevine i konzervans.

- c) Supstrat otopina, pH 7.5, koja sadrži <0.1% hidrogenperoksida, stabilizatore, pojačivače i protu-mikrobne tvari.
- d) 5% otopina 3, 3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid kromogen.
- e) Doublestain Block - Blocking solution.
- f) Polimer dekstrana vezan na sekundarna protutijela protu mišjih i štakorskih imunoglobulina. Otopina sadrži stabilizirajuće bjelančevine i konzervans.
- g) Polimer dekstrana konjugiran s alkalnom fosfatazom i imunoglobulinima, pohranjen u Tris/HCl puferu koji sadrži stabilizirajuće bjelančevine i konzervans.
- h) Supstrat otopina -Permanent Red Substrate Buffer.
- i) Otopina Permanent Red Chromogen

3.1.6. Biološki materijal

Uzorke decidualnog tkiva i periferne krvi (10-20 ml) dobivali smo s Klinike za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta u Rijeci od 60 zdravih trudnih žena gestacijske dobi 6 do 10 tjedana koje su se podvrgle elektivnom prekidu trudnoće imaju bar jedno živorođeno dijete

i pristale su da se dobiveni materijal koristi u znanstveno-istraživačke svrhe. Iz istraživanja isključene su diploidne trudnoće, a vijabilnost zametka utvrđena je ultrazvučnim pregledom

3.2. METODE

3.2.1. Metoda imunohistokemije

3.2.1.1 .Uklapanje decidualnog tkiva u parafin

Svježe decidualno tkivo rane trudnoće inkubirano je 18 sati u otopini 4% paraformaldehida zbog fiksacije antigena, a zatim ispirano pod mlazom tekuće vode tijekom 3 sata. Uranjanjem u 20% etilni alkohol, a zatim višekratnim ispiranjem tkiva u etilnom alkoholu sve veće koncentracije (50-90%) po 60 min, uklanjajući smo vodu iz decidualnog tkiva. Naposljetku smo tkivo držali 3 h u 100% etilnom alkoholu. Daljnjim ispiranjem u 100% ksilolu (3 x 60 min) uklanjali smo alkohol iz tkiva, zbog uklapanja u Paraplast. To je parafin s plastičnim polimerom, koji nije topljiv u vodi i alkoholu, nego samo u ksilolu. Paraplast smo otopili na 57-60°C u parafinskoj peći, a zatim smo decidualno tkivo u kazetama iz ksilola uronili u Paraplast (3 x 60 min), te ohladili na sobnoj temperaturi do sljedećeg dana. U parafin uklopljeno tkivo rezali smo na mikrotomu u rezove debljine 3 µm, stavljali u mlaku vodu (15 min) kako bi se izravnali nabori tkiva nastali rezanjem i nanosili na silanizirana predmetna stakalca. Rezove smo sušili preko noći u suhom inkubatoru na 37°C. Tkiva smo pohranili u kutijama za držanje stakalaca na sobnoj temperaturi do obilježavanja.

3.2.1.2. Uklanjanje parafina iz rezova decidualnog tkiva

Neposredno prije obilježavanja iz tkivnih rezova smo uklonili parafin uranjanjem preparata u kivetu s otopinom Tissue clear na bazi ksilola 3 x 5 min. Zatim smo isprali Tissue clear uranjanjem preparata u sve razrjeđenije otopine etilnog alkohola (3 x 5 min u 100% etilni alkohol, 3 x 5 min u 96% etilni alkohol, 3 x 5 min u 75% etilni alkohol) i na kraju smo rezove uronili u TBS 10 minuta.

3.2.1.3. Postupak otkrivanja antigena uz pomoć mikrovalne pećnice

Stanične bjelancevine (biljezi) se denaturiraju tijekom izlaganja toplini od 57-60°C tijekom postupka uklapanja u parafin. Kako bi biljezi ponovno poprimili konformaciju koju su posjedovali prije uklapanja, preparate decidualnog tkiva uronili smo u plastičnu kivetu ispunjenu s 10 mM otopinom limunske kiseline, pH 6,0 i grijali u mikrovalnoj pećnici do vrenja 3 x 5 min. Između dva grijanja isparenu vodu nadoknadili smo destiliranom vodom. Na kraju smo preparate ohladili na sobnoj temperaturi (30 min), a zatim uronili u TBS za imunohistokemiju zbog ponovnog hidriranja preparata.

3.2.1.4. Obilježavanje antigena

Dvostrukim obilježavanjem antigena na rezovima decidualnog tkiva istovremeno smo dokazivali CD14 i CD209 biljege uz pomoć EnVision TM G/2 Doublestain System. Nakon što su biljezi ponovno poprimili svoju prvotnu konformaciju, nespecifično smo vezanje blokirali inkubiranjem preparata (5 min) s blokirajućom otopinom iz navedenog kita u tamnoj i vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Sve daljnje inkubacije vršile su se pod istim uvjetima.

Rezove smo inkubirali (1 h, +4° C) s nekonjugiranim protu-CD14 protutijelom ili neobilježenim mišjim IgG2a (razrijeđenim u omjeru 1:100) te isprali 3 x 5 min uranjanjem u TBS medij za imunohistokemiju. Rezove tkiva smo pokrili s 200 µL Polymer/HRP, inkubirali 10 min i isprali 3 x 5 min uranjanjem u TBS. Zatim smo nanijeli na rezove 200 µL radne koncentraciju 3,3 diaminobenzedin (DAB) kromogena ranije pripremljenog na način da smo pomiješali 1 mL DAB+ Substrate Buffer s 1 kapi (25-30 µL) DAB+ Chromogen (oboje iz navedenog sistema za obilježavanje) i inkubirali 5 minuta. Reakcija je završena ispiranjem (deionizirana voda 5 min, TBS 2 x 5 min). Kako bismo mogli nastaviti obilježavanje drugog biljega inkubirali smo rezove s Doublestain Block 3 (± 1) minute, isprali stanice uranjanjem

u TBS (3 x 5 min), a zatim smo nanijeli na rezove protu-CD209 protutijelo (opisano u Tablici 1) i inkubirali ih 1 sat na +4°C.

Nakon ispiranja i primjene Rabbit/Mouse LINK-a (uključenog u komercijalni sistem) rezovi su inkubirani s 200 µL Polymer/alkalne fosfataze tijekom 10 min i ponovno isprani. 200 µL radne otopine Permanent red kromogena u razrjeđenju 1:100, Permanent Red Substrate Buffer dodan je na stanice tijekom 10 minuta, a zatim je reakcija zaustavljena ispiranjem u deioniziranoj vodi. Otpad koji je sadržavao kromogene bio je sakupljen u aluminijsku foliju i odložen u kontejner za tvari štetne i opasne po zdravlje. Jezgre smo obojili s profiltriranom otopinom hematoxylina Gill No3 tijekom inkubacije od 2 minute, rezove smo uronili u deioniziranu vodu (1 x 5 min), isprali u tekućoj vodi (10 min) i uklopili u Entellan.

3.2.2. Dobivanje leukocitnih populacija iz decidue prvog tromjesečja trudnoće i periferne krvi trudnih žena

3.2.2.1. Dobivanje suspenzije leukocita iz decidualnog tkiva

Kako bismo odvojili decidualno tkivo od zaostale krvi, višekratno smo ga ispirali u sterilnom RPMI 1640 mediju. Isprano decidualno tkivo mehanički smo usitnili na komadiće veličine 2x2 mm, stavili u Erl-Meyerovu tikvicu sa sterilnim magnetom presvučenim teflonom, te dodali u otopinu 0,1% kolagenaze tipa IV (volumni omjer tkivo:otopina, 1:1) i stavili na magnetsku mješalicu.

Decidualno tkivo ravnomjerno se miješalo tijekom 45-60 minuta u ovisnosti o količini na temperaturi od 37° C. Tako dobivenu suspenziju profiltrirali smo dva puta kroz najlonsku mrežicu (80 µm) kako bismo otklonili stanični detritus, potom smo dodali RPMI 1640 medij i centrifugirali u koničnim epruvetama 10 minuta na 350 g kako bismo istaložili stanice. Na stanični talog dodali smo 10 ml RPMI 1640 medija, temeljito resuspendirali pipetom i pažljivo nasložili na gradijent gustoće (10 ml, sterilni Lymphoprep), a zatim centrifugirali 20 minuta na 600 g, bez opcije kočenja pri zaustavljanju. Time smo izdvojili decidualne mononuklearne stanice (DMS) koje

su se nalazile neposredno iznad sloja Lymphoprepa. Pomoću Pasteurove pipete sakupili smo DMS epruvetu te smo ih dva puta centrifugirali u 10 ml RPMI 1640 medija tijekom 10 minuta na 350 g. Dobivene stanice smo resuspendirali u RPMI 1640 mediju za kulturu tkiva u koncentraciji od 10^6 /ml. Broj stanica određivali smo pomoću Neubauerove komorice, a vijabilnost stanica provjeravali smo tripanskim modrilom.

3.2.2.2. Dobivanje suspenzije leukocita iz periferne krvi

10 ml periferne krvi trudnih žena naslojili smo na gradijent gustoće (10 ml, sterilni Lymphoprep) i centrifugirali 20 minuta na 600 g te tako izdvojili suspenziju mononuklearnih stanica periferne krvi koje se nalaze u prstenu iznad sloja Lymphoprepa. Tako formirani prsten sakupili smo pažljivim pipetiranjem Pasteurovom pipetom, resuspendirali u 10 ml RPMI 1640 medija te isprali centrifugiranjem 10 minuta na 350 g. Dobivene stanice resuspendirali smo u RPMI mediju za kulturu tkiva u koncentraciji 10^6 stanica/ml medija. Stanice smo brojali u Neubauerovoj komori, a vijabilnost stanica provjeravali smo tripanskim modrilom.

3.2.2.3. Dobivanje adherentne i neadherentne frakcije decidualnih stanica

Suspenziju DMS pohranili smo u RPMI mediju za kulturu stanica i inkubirali preko noći (18 h) u Petrijevoj zdjelici različitih veličina u ovisnosti o broju izdvojenih stanica u sterilnim uvjetima inkubatora, na 37°C uz 5% CO₂. Nakon 18 h odvojili smo neadherentnu frakciju stanica koju čine limfociti i zrele dendritičke stanice pažljivim pipetiranjem, a adherentnu frakciju stanica koju čine decidualni makrofagi, trofoblast, žljezdane i endotelne stanice, nezrele dendritične stanice i stromalne stanice odvojili smo s podloge strugačem za stanice. Tako dobivene stanične suspenzije isprali smo u RPMI 1640 mediju, a broj stanica i njihovu vijabilnost

odredili smo pomoću Neubauerove komorice i bojenja stanica tripanskim modrilom. Rukovodili smo se metodom opisanom u našem ranije objavljenom radu (61).

3.2.3. Istodobno određivanje površinskih i unutarstaničnih biljega metodom direktne i indirektne imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom

DMS (2.5×10^5 stanica po uzorku) netretirane ili tretirane s MUC 1 (25, 50 or 100 $\mu\text{g/ml}$) inkubirane su kroz 30 min na ledu. Nakon inkubacije, površina stanica obilježena je s indirektnim PAM-1 protu MR monoklonskim protutijelom (Tablica 1.) i FITC konjugiranim GAM poliklonskim protutijelom te potom obilježena s CD14 PE monoklonskim protutijelom ili je obilježena s direktno konjugiranim DCN49 protu-CD209 PE protutijelom i protu-CD14 FITC.

Površinske antigene na CD14⁺ stanicama suspenziji svježe izoliranih leukocita periferne krvi trudnih žena i svježe izdvojenim ili 18 sati kultiviranih decidualnih mononuklearnih stanica u prisustvu MUC1 ili medija za kulturu stanica obilježavali smo sljedećim protutijelima: protu-CD16, protu-MR, protu-CD209, protu-CD163, protu-CC receptor (CCR) 5, protu-CCR7, protu-CD1a, protu-CD83, protu-CD80, protuCD86, protu-HLA-DR, protu-interleukin (IL) 1 receptor (R) tip II ili protu-D6 protutijelom (sva protutijela opisana su u tablici 1)

Citokini (IL-18, IL-15, IL-10, IFN- γ , IL-4) i kemokini (CCL3, CCL17, CCL22) obilježavani su u permeabiliziranim CD14⁺ stanicama iz suspendizije DMS koje su kultivirane u mediju za kulturu ili stimulirane s MUC 1 (200 $\mu\text{g/ml}$) tijekom 18 sati na 37°C, u atmosferi s 5% CO₂. Citokini (IL-4 i IFN- γ), kemokini (CCL3, CCL17 i CCL22) i medijatori citotoksičnosti (perforin, FasL, TRAIL) obilježavani su intracelularno u magnetskim izdvajenjem obogaćenim singeničnim decidualnim CD56⁺ stanicama, koje su dobivene nakon kultivacije kroz 18 sati u mediju za kulturu stanica ili u prisustvu MUC 1 te nakon ko-kultivacije s decidualnim CD14⁺ stanicama nestimuliranim i stimuliranim s MUC 1 (200 $\mu\text{g/ml}$) kroz 5 sati. Izraženost NK

staničnih receptora određivali smo na magnetskim izdvajanjem obogaćenim CD56⁺ stanicama koristeći protutijela protiv Nkp44, Nkp46, Nkp30, NKG2D, NKG2A, NKG2C i MICA/B. Vodili smo se protokolom za obilježavanje stanica koji je ranije objavljen (61). Uzorci stanica koji su korišteni za unutarstanično obilježavanje citokina prije obilježavanja su inkubirani s forbol-miristat-acetatom (6 μ M), ionomicinom (1 μ M) i monezimom (3 μ M) kroz 5 sati na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂. Uzorci u kojima je određivan IL-10 pretretirani su s LPS-om (1 ng/ml) i monenzimom (3 μ M) kroz 18 sati. Uzorci su inkubirani s odgovarajućim protutijelima na +4 °C kroz 30 min, a stanice na kojima se određivalo izražavanje biljega na površini stanica ispirane su s hladnim FACS medijem. Saponin smo koristili za permeabilizaciju (20 min na sobnoj temperaturi) i ispiranje stanica pri obilježavanju unutarstaničnih antigena. Izotipske kontrol, FITC- ili PE-konjugirana mišja protutijela korištena su kao negativna kontrola za svako pojedino korišteno protutijelo kao što je navedeno u tablici 1. Obilježene stanice fiksirane su u 2% paraformaldehidu.

3.2.4. Test vezanja liganada za domenu za prepoznavanje ugljikohidrata na receptorima za endocitozu

Svježe izdvojene DMS (3-5x10⁵ stanica po uzorku) inkubirali smo 20 min s 10% FCS, zbog uklanjanja nespecifičnog vezanja i centrifugirali stanice 350 g 10 min. Zatim smo stanicama dodali MUC1 u završnoj koncentraciji 25, 50 ili 100 μ g/ml ili samo FACS medij tijekom 30 min na +4°C kako bismo osigurali najpovoljnije uvjete za vezanje liganada za domenu koja prepoznaje ugljikohidrate na receptorima za endocitozu. U sljedećem koraku smo bez ispiranja stanicama dodali protutijela specifična za domenu koja prepoznaje ugljikohidrate na receptorima za endocitozu i to manoznom receptoru (nekonjugirano PAM-1 protutijelo) i na receptoru CD209 (PE konjugirano DCN 46 protutijelo) i inkubirali stanice daljnjih 30 min na +4°C. Zatim smo stanice centrifugirali u FACS mediju tijekom 10 min na 350 g, te dodali

kozje protu-mišje protutijelo konjugirano s FITC–om u uzorke obilježavane nekonjugiranim PAM-1 protutijelom (30 min +4°C). Nakon ponovnog ispiranja uzorke stanica smo obilježili nekonjugiranim ili PE konjugiranim protu-CD14 protutijelima u ovisnosti o izboru fluorokroma u prethodnom koraku obilježavanja. Pojedini uzorci su bili obilježavani nespecifičnim protutijelima istog podrazreda, kao kontrola nespecifičnog vezanja.

3.2.5. Određivanje endocitoze pomoću FITC-dextrana

Svježe izdvojene DMS ($3-5 \times 10^5$ stanica po uzorku) inkubirali smo 20 min s 10% FSC. Stanice smo zatim centrifugirali 10 min 400 g i resuspendirati u hladnom mediju za endocitozu. Stanicama smo dodali MUC1 ili mannan u završnim koncentracijama 50, 100 ili 200 $\mu\text{g/ml}$, ili medij za kulturu stanica u ukupnom volumenu od 100 μl i inkubirali daljnjih 30 minuta na ledu. Na taj smo način osigurali najjače vezanje potencijalnog liganda za domen koji prepoznaje ugljikohidrate na manoznom receptoru za endocitozu. Potom smo dodali hladni (4°C) ili topli (37°C) FITC-dextran u završnoj koncentraciji od 0.5 mg/ml i stanice inkubirali 30 minuta na ledu (nepovoljni uvjeti za internalizaciju) ili na 37°C (najpovoljniji uvjeti za internalizaciju u humane stanice). Endocitozu smo zaustaviti ispiranjem stanica u hladnom FACS mediju i fiksiranjem u 4% paraformaldehidu 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, stanice smo inkubirali 30 minuta s PE-konjugiranim anti-CD14 monoklonskim protutijelom ili PE-konjugiranim IgG2a, oprali dva puta u FACS mediju i resuspendirali u 2% paraformaldehidu.

Isti pokus ponovili smo s DMS koje su bile inkubirane 18 h samo u mediju ili u prisustvu lipopolisaharida u završnoj koncentraciji (1, 10 ili 100 ng/ ml) na 37°C u vlažnoj sredini uz 5% CO₂.

Uzorke smo analizirali na protočnom citometru i izrazili kao srednji intenzitet fluorescence ili MFI (od engl. Mean florescence intensity) za FITC-dextran. Rukovodili smo se metodom opisanom u našem ranije objavljenom radu (60).

3.2.6. Magnetsko izdvajanje pojedinih staničnih subpopulacija

Za odvajanje pojedinih staničnih subpopulacija pomoću magnetskog polja koristili smo VarioMACS separator te s obzirom na broj stanica odgovarajuću MACS kolumnu. Kada je broj stanica korištenih za separaciju bio do 10^7 stanica/ml koristili smo MS kolumnu, dok smo LS kolumnu koristiti za broj stanica veći od 10^8 /ml.

CD56⁺ stanice (stanice NK) smo izdvojili iz suspenzije decidualnih limfocita (neadherentne frakcije DMS) neposredno, dok smo iz adherentne frakcije DMS najprije izdvojili CD1a pozitivne stanice (dendritične stanice), a zatim i CD14⁺ stanice (makrofage).

3.2.6.1. Pozitivno magnetsko odvajanje stanica NK

Staničnu suspenziju decidualnih neadherentnih stanica profiltrirali smo radi uklanjanja nakupina stanica, isprali u hladnom FACS mediju te na stanični talog dodali 80 μ L hladnog FACS medija i 20 μ L specifičnih protutijela obilježenih magnetskim kuglicama (protu-CD56 microbeads, Miltenyi Biotec, Njemačka) na 10^7 stanica te ih inkubirali 15 minuta na 4°C. Po isteku inkubacije stanice smo centrifugirali 10 minuta na 400 g, resuspendirali u 500 μ l FACS medija te propustili kroz magnetsku kolumnu LS (Miltenyi, Biotec) u magnetskom polju pomoću VarioMACS separatora. Negativne stanice (stanice koje nisu vezale protutijela s magnetskim kuglicama) “prolaze” kroz kolumnu, dok pozitivne stanice (stanice koje su vezale protutijela s magnetskim kuglicama) ostaju u kolumni. Kolumnu smo zatim ispirali četiri puta s 3 mL hladnog FACS medija, potom smo kolumnu uklonili iz sustava za separaciju i dodali 5 ml FACS medija te protisnuli stanice klipom. Tako sakupljene stanice predstavljaju oplemenjenu frakciju CD56⁺ stanica. Dobivene stanice smo potom isprali u FACS mediju, resuspendirali u RPMI 1640 mediju za kulturu stanica i potom izbrojali. Čistoću CD56⁺ stanica odredili smo metodom imunofenotipizacije tako da smo uzorke obojili s Cy-Chrome (PE-Cy5)-konjugiranim

anti-CD56 monoklonskim protutijelom ili izotipskom kontrolom, PE-Cy5-konjugirani IgG1. Vijabilnost stanica utvrdili smo pomoću propidijum-jodida (PI; 0.5 µg/mL/10⁶ stanica, Sigma-Aldrich, Chemie, Daisenhofen, Njemačka).

3.2.6.2. Uspostavljanje protokola za magnetsko pročišćavanje decidualnih makrofaga

CD14⁺ stanice smo izdvojili iz adherentne frakcije decidualnih mononuklearnih stanica nakon izdvajanje CD1a⁺ stanica i to tako što smo staničnu suspenziju filtrirali radi uklanjanja nakupina stanica, isprali u hladnom FACS mediju te na stanični talog dodali 80 µl FACS medija i 20 µL specifičnog protutijela obilježenog magnetskim kuglicama (mišji-protu-humani CD1a monoklonsko protutijelo, Miltenyi Biotec) na 10⁷ stanica i inkubirali 15 minuta na +4°C. Po isteku inkubacije stanice smo centrifugirali 10 minuta na 400 g, resuspendirali u 500 µl FACS medija te propustili kroz magnetsku kolumnu LS (Milteny, Biotec) u magnetskom polju pomoću Vario-MACS separatora. Negativne stanice (stanice koje nisu vezale protutijela s magnetskim kuglicama) “prolaze” kroz kolumnu, dok pozitivne stanice (stanice koje su vezale protutijela s magnetskim kuglicama) ostaju u kolumni. Kolumnu smo zatim ispirali četiri puta s 3 mL hladnog FACS medija, potom smo kolumnu uklonili iz sustava za separaciju i dodali 5 ml FACS medija te protisnuli stanice klipom. Tako sakupljene stanice predstavljaju oplemenjenu frakciju CD1a⁺. Negativnu frakciju smo dalje upotrijebili za izolaciju CD14⁺ stanica slijedeći isti protokol kao i za izdvajanje CD56⁺ stanica i CD1 a⁺ stanica koristeći protu-humano CD14⁺ protutijelo konjugirano s magnetskim kuglicama (20 µl /10⁷ stanica, mouse IgG1, Miltenyi Biotec).

3.2.7. Metoda ELISA

3.2.7.1 Priprema supernatanta pročišćenih decidualnih CD14⁺ stanica

Decidualne CD14⁺ stanice pročišćene i oplemenjene magnetskim izdvajanjem kultivirane su u RPMI mediju za kulturu stanica u koncentraciji 10⁶/ml tijekom 18 sati in vitro. Na kraju kultivacije nadtalog smo pokupili pipetom i centrifugirali zbog taloženja slučajno pokupljenih stanica. Nakon centrifugiranja nadtalog je lagano pokupljen plastičnom pipetom i odmah upotrebljen ili pohranjen u tubicama za zamrzavanje na -20°C do upotrebe.

3.2.7.2. Određivanje kemokina metodom ELISA

Lučenje CCL17 (TARC) i CXCL10 (IP-10), određivali smo u magnetskim izdvajanjem obogaćenoj kulturi CD14⁺ stanica pomoću ELISA metode upotrebom komercijalno dostupnih protutijela i otopina (ELISA kits, R&D Systems, Minneapolis, MN) prateći upute proizvođača i naše prethodno iskustvo (66). Ukratko, 96-U rupičnu ploču obložili smo sa 100 µl protutijela za vezanje (uključeno u kit) razrijeđeno s karbonatnim puferom u koncentraciji 2 µg/ml za CCL17 i CXCL10 te inkubirali preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga smo ploču aspirirali i isprali tri puta u PBS mediju, a nespecifično vezanje blokirali smo s 1% BSA. Na ploče smo potom dodali 100 µl/rupici nerazrijeđenog ili razrijeđenog (1:2 i 1:4 u PBS/1% BSA) supernatanta dobivenog od magnetskim izdvajanjem obogaćene kulture CD14⁺ stanica, a standardne krivulje dobili smo koristeći serijska razrjeđenja počevši s koncentracijom 500 pg/ml za CCL17 ili 2000 pg/ml za CXCL10. Nakon inkubacije kroz dva sata na sobnoj temperature, rupice su isprane tri puta. Biotilirana protutijela (uključena u kit) (100 µl/rupici) dodana su u sljedećim koncentracijama: 100 ng/ml za CCL17 i CXCL10, a zatim dalje inkubirana kroz 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja (3x) dodali smo 100 µl/rupici streptavidin-konjugirane horseradish-peroxidase (uključena u kit) razređene 1:400 u PBS/0.05%. Zatim smo dodali Tween 20 kroz 45 minuta. Nakon ispiranja reakciju smo razvili dodatkom Supstrat-otopine (uključene u

kit) koja je dobivena mješanjem obojenog reagensa A (H_2O_2) i obojenog reagensa B (tetramethylbenzidin)e u omjeru 1:1 tijekom 20 minuta izbjegavajući izravnu izloženost svjetlu. Optička gustoća određena je odmah nakon inkubacije koristeći ELISA čitač podešen na 405 nm.

3.2.8. Testovi ko-kultivacije decidualnih CD56⁺ stanica i CD14⁺ stanica

3.2.8.1. Polarizacija stanica NK

Citokine IL-4 i IFN- γ određivali smo u magnetskim izdvajanjem pročišćenim singeničnim decidualnim CD56⁺ stanicama koje su ko-kultivirane s decidualnim CD14⁺ stanicama koje su bile prethodno inkubirane samo u mediju ili u prisustvu MUC1 (100 μ g/ml), te u pročišćenim decidual CD56⁺ stanicama koje su kultivirane u mediju ili u prisustvu MUC1 kroz 5 sati. Omjer CD14⁺:CD56⁺ stanica bio je 1:5, a stanice su kultivirane u vlažnoj atmosferi na 37 °C s 5% CO₂. Površinski biljeg CD56 obilježen je pomoću PE-Cy5 konjugiranog protu-CD56 protutijela. Stanice smo permeabilizirali i obilježili unutarstanične antigena prema ranije navedenom protokolu za obilježavanje citokina. Rezultati su izraženi kao razlika u postotku pozitivnih stanica između uzoraka obilježenih protutijelom od važnosti i izotipske kontrole.

3.2.8.2. Proliferacija stanica NK

Kako bismo odredili proliferacije decidualnih stanica NK u prisustvu CD14⁺ stanica slijedili smo metodu koju je prvi opisao Lyons (301), a koja je prilagođena za decidualne stanice NK (61). Pročišćene decidualne CD56⁺ stanice isprali smo dva puta u PBS mediju s 0,1% BSA (350 g 10 min), podesili 10⁶/ml i inkubirali s 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester u završnoj koncentraciji 10 mM, kroz 10 min na 37° C. CFSE se spontano i nepovratno veže za unutarstanične bjelančevine. Nakon isteka inkubacije, dodali smo 1 mL FCS kako bismo spriječili preintenzivno bojenje stanica na način da dozvolimo vezanje viška CFSE boje na

bjelančevine iz medija. Zatim smo stanice isprali dva puta u mediju za kulturu stanica (350 g 10 min). CD56⁺ stanice obilježene s CFSE kultivirali smo s decidualnim CD14⁺ stanicama (omjer stanica 1:0.25, 1:0.5, 1:1 i 1:2), koje su 96-U rupičnim pločama inkubirane kroz 5 sati i u mediju za kulturu stanica ili u prisustvu MUC 1 (200 µg/ml) u ukupnom volumenu od 200 ml na 37° C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ u inkubatoru. Nakon inkubacije, stanice NK obilježene su PE- konjugiranim protu-CD56 monoklonskim protutijelom, a PI (0.5 µg/mL) je korišten kako bi se isključile mrtve stanice prije i nakon obilježavanja s CFSE na početku i na kraju testa proliferacije (vrijeme „0“), nakon 48h kultivacije u mediju ili u prisustvu CD14⁺ stanica u različitim koncentracijama. Rezultati su izraženi kao postotak CFSE-obilježenih CD56⁺ stanica.

3.2.8.3. PKH-26 (red) test citotoksičnosti

DMS smo kultivirali u Petrijevoj zdjelici samo u mediju, u prisustvu MUC1 (200 µg/ml) ili LPS (100 ng/ml) tijekom 18 h u vlažnoj sredini na 37°C i 5% CO₂, a zatim smo odvojili decidualne limfocite od adherentnih stanica na gore opisani način. Iz populacije decidualnih limfocita pozitivnom magnetskim izdvajanjem smo pročistili CD56⁺ stanice NK, podesili njihov broj na 5x10⁶/ml i čuvali na ledu do stavljanja u dodir sa ciljnim makrofagima.

Adherentnu populaciju stanica smo 4 puta centrifugirali 350 g 10 min u u RPMI mediju kako bi isprali FCS iz medija za kulturu stanica, obilježili PKH-26 crvenom bojom laganim miješanjem stanica s bojom uz pomoć pipete. Boja se ireverzibilno veže za stanične bjelančevine. Obilježavanje se zaustavilo dodatkom humanog AB seruma i RPMI medija za kulturu stanica, kako bi se omogućilo vezanje viška boje za proteine. Nakon bojenja stanice smo najprije pročistili od CD1a⁺ dendritičkih stanica, a zatim smo iz CD1a negativne populacije oplemenili CD14⁺ makrofage na način opisan ranije pod naslovom magnetsko pročišćavanje stanica. Provjerili smo čistoću i viabilnost izdvojenih makrofaga metodom imunofluorescencije uz pomoć propidij

jodida ($0,25 \mu\text{g/ml}$) i protočnog citometra. Zatim su stanice podešene na koncentraciju $10^5/\text{ml}$. Neki uzorci ciljnih stanica su prije stavljanja u neposredan dodir s CD56^+ izvršnim stanicama inkubirane s protu MIC A/B protutijelim tijekom 30 min na ledu. Izvršnim CD56^+ stanicama NK također smo prethodno dodali protu-perforinska, protu-NKP30, protu-NKp44, protu-NKp46 ili protu-NKG2D protutijela u koncentraciji $10 \mu\text{g/ml}$, kako bi ispitali mehanizam citotoksičnosti. Izvršne i ciljne stanice stavljane su u epruvete u omjerima 6:1, 12,5:1, 25:1 te 50:1, centrifugirane 5 min na 500 okretaja /min zbog postizanja boljeg stanično-staničnog dodira i kultivirane u inkubatoru na 37°C uz 5% CO_2 tijekom 2 sata.

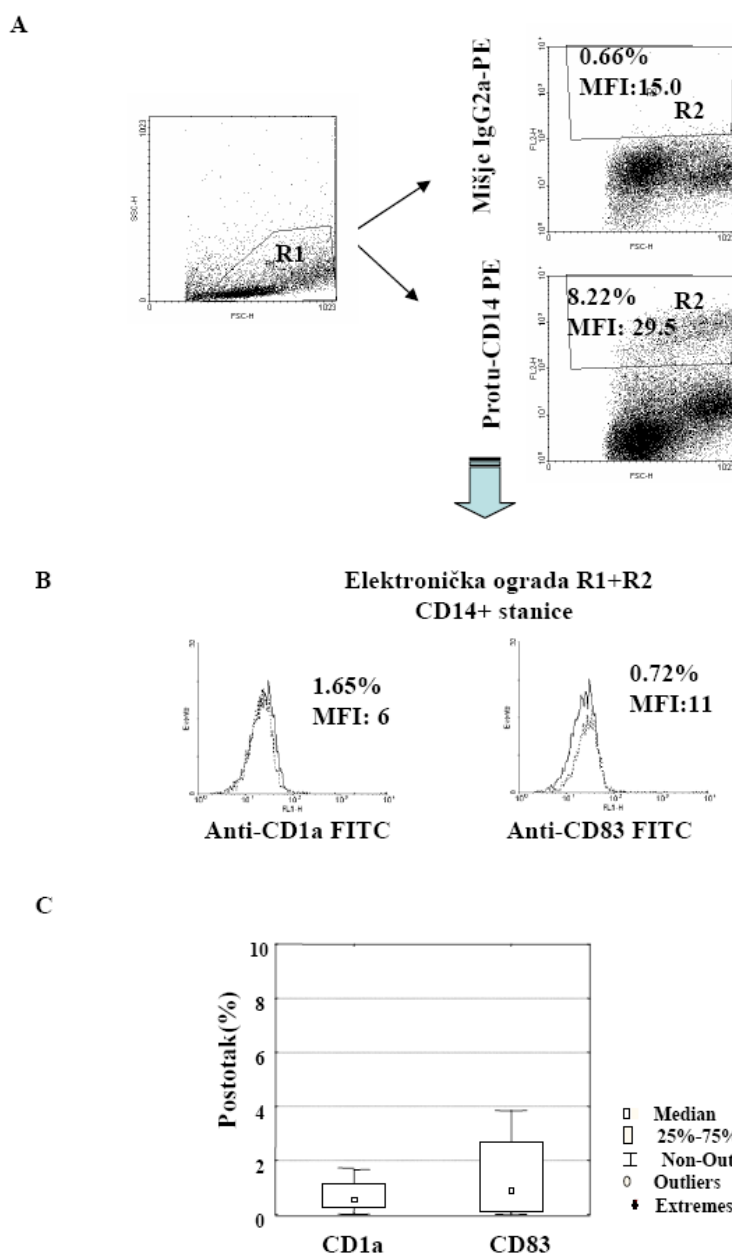
3.3. Statistička obrada podataka

Dobivene podatke statistički smo obradili koristeći neparametrijski Kruskal-Walis test da bismo utvrdili između kojih grupa postoji statistički značajna razlika uz pomoć računalnog programa Statistica for Windows, Kernel release 8 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Razlike između ispitivanih skupina smatrali smo značajnim kada je $p < 0,05$. Mann-Whitney U test koristili smo za utvrđivanje između kojih dviju skupina postoji statistički značajna razlika, a p vrijednost smo korigirati s obzirom na broj uspoređivanih grupa. Za prikaz rezultata koristit će se programi Statistica for Windows ili Microsoft Office Excel 2003, dio Microsoft Professional Edition 2003., Microsoft Corporation.

4. REZULTATI

4.1. Fenotipska obilježja decidualnih CD14⁺ stanica u usporedbi s autolognim CD14⁺ stanicama periferne krvi

4.1.1. Izražaj CD1a i CD83 biljega na CD14⁺ stanicama decidue prvog tromjesečja trudnoće. Dvostrukim obilježavanjem CD14 i CD1a biljega, odnosno CD14 i CD83 biljega metodom imunoflorescencije na DMS prvog tromjesečja trudnoće istražili smo mogućnost istovremenog izražavanja navedenih biljega na istim stanicama. Dobivene rezultate smo analizirali protočnom citometrijom tako da smo elektroničku ogradu, označenu kao R1 postavili na DMS, na temelju njihove tipične veličine (FSC parametar, od engl. Forward scatter) i granuliranosti (SSC parametra, od engl. Side scatter). Na tako odabranoj populaciji stanica odredili smo postotak CD14⁺ stanica i MFI za CD14 molekulu u ogradi R2 u odnosu na obilježavanje protutijelom istog podrazreda, ali irelevantne specifičnosti (mišje IgG2a) što je prikazano na Slici 8A. U prikazanom primjeru zastupljenost CD14⁺ stanica među DMS iznosila je 8,22% pri čemu je MFI za CD14 molekulu 29,5 u usporedbi s kontrolnim obilježavanjem (0,66%, MFI 15). Unutar elektroničkih ograda R1 i R2 analizirali smo zastupljenost CD83 i CD1a antigena na CD14⁺ stanicama (Slika 8B). Puna krivulja na histogramima prikazuje obilježavanje CD14⁺ stanica s protu-CD1a, odnosno protu-CD83 protutijelom, dok iscrtkana krivulja u histogramu prikazuje obilježavanje kontrolnim protutijelom istog podrazreda. U ogleđnom primjeru 1,65% CD14⁺ stanica izražava CD1a biljeg, a 0,72% CD83 biljeg više nego u obilježavanju kontrolnim protutijelom (Slika 8B). MFI za obje molekule je malen i iznosi 6 za CD1a biljeg te 11 za CD83 biljeg (Slika 8B). Ovi rezultati se podudaraju s ostalih 8 pokusa učinjenih na isti način, a čija vrijednost središnjeg mjesta (25.-75. percentile) iznose 0,87% (0,15-2,11) za CD83 i 0,55 (0,37-0,87) za CD1a biljeg na površini decidualnih CD14⁺ stanica (Slika 8C).



Slika 8. Ogledni primjer analize izraženosti površinskih biljega CD1a i CD83 na CD14⁺ stanicama u svježe izdvojenim DMS prvog tromjesečja zdrave trudnoće. Način postavljanja elektroničke ograde na DMS (R1) te postotak CD14⁺ stanica unutar elektroničke ograde (R2) prikazan je u točkastim grafovima (A). Izražaj CD1a i CD83 biljega na decidualnim CD14⁺ stanicama prikazuju histogrami (B), dok su vrijednosti središnjeg mjesta za navedene biljege dobiveni analizom 9 različitih pokusa prikazani i u grafu C.

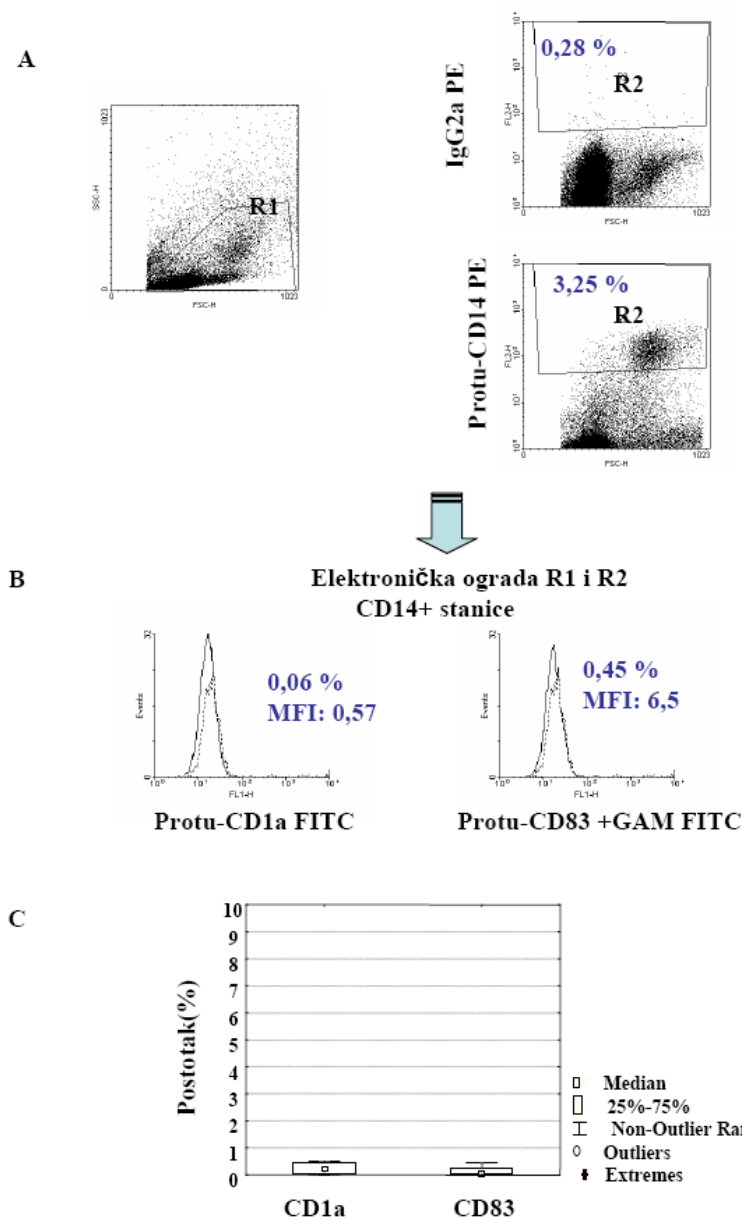
4.1.2. Izražaj CD1a i CD83 biljega na CD14⁺ stanicama periferne krvi trudnih žena

Na isti način kao što smo analizirali izražaj CD1a i CD83 molekule na DMS, analizirali smo izražaj navedenih biljega na CD14⁺ stanicama periferne krvi. Slika 2A pokazuje zastupljenost CD14⁺ stanica među mononuklearnim stanicama periferne krvi (R1), gdje čine 3,21% stanica u usporedbi s obilježavanjem kontrolnim protutijelom istog podrazreda, irelevantne specifičnosti (IgG2a 0,28%). Potom smo na CD14⁺ stanice postavili dodatnu elektroničku ogradu označenu kao R2 (Slika 9A). Unutar elektroničkih ograda R1 i R2 analizirali smo zastupljenost CD83 i CD1a antigena. Ogledni histogrami pokazuju da samo neznatan broj CD14⁺ stanica periferne krvi trudnih žena izražava CD83 (0,45%) i CD1a (0,06%) molekulu na svojoj površini pri čemu je MFI za CD1a 0,57, a za CD83 6,5 (Slika 9B). Graf na Slici 9C prikazuje da svega 0,23% (0,04-0,4) CD14⁺ stanica periferne krvi trudnih žena izražava CD1a i 0,05% (0,007-0,18) izražava CD83 biljeg kako je analizirano u 9 različitih pokusa.

4.1.3. Izražaj CC receptora (CCR) 5 i CCR 7 na CD14⁺ stanicama decidue prvog tromjesečja trudnoće i periferne krvi trudnih žena.

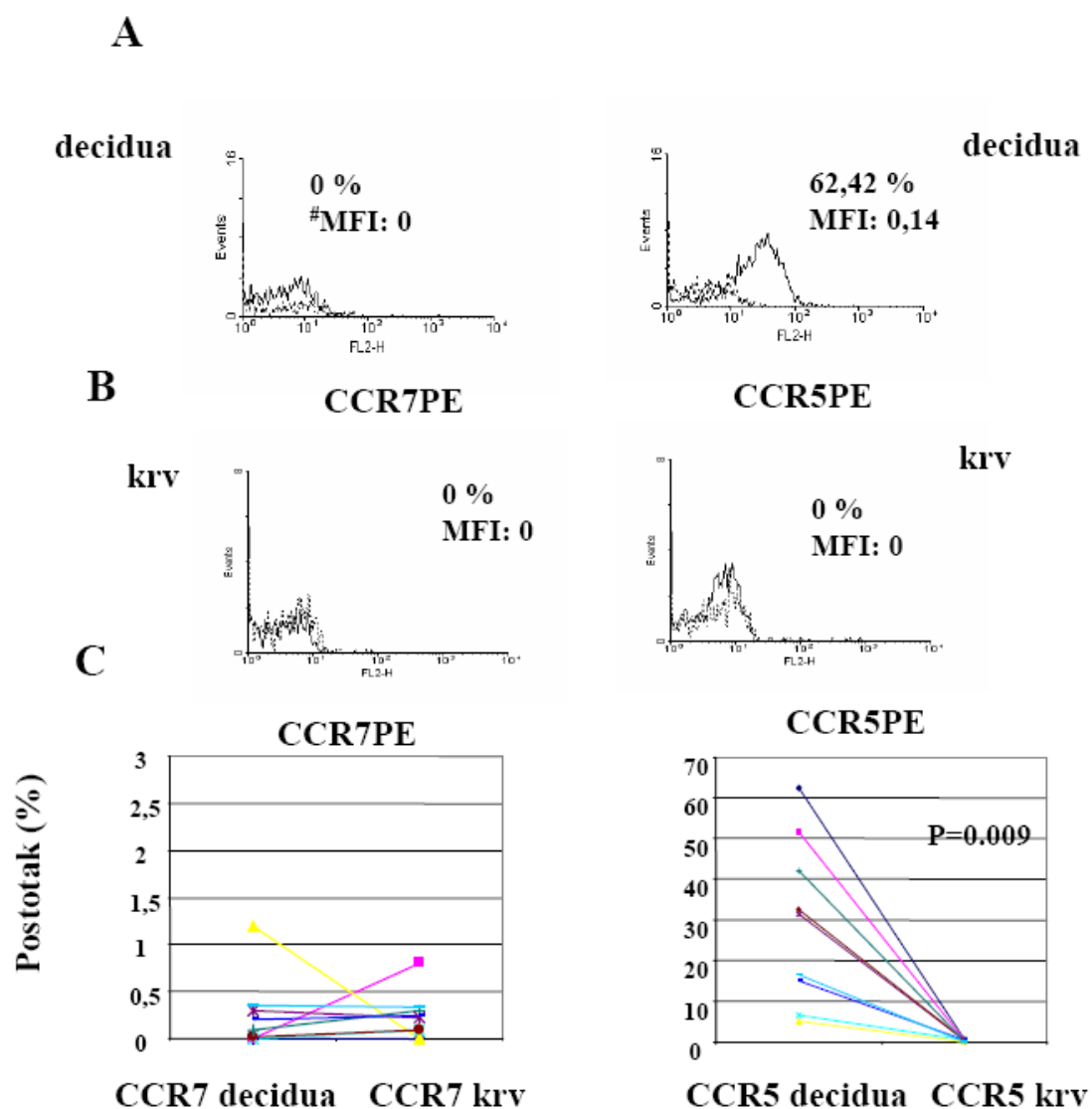
Izraženost kemokinskih receptora na površini mononuklearnih stanica periferne krvi i decidue određivali smo metodom direktne imunoflorescencije. Pri tome smo koristili monoklonska protutijela protiv CD14 biljega te kemokinskih receptora CCR5 i CCR7 na već opisani način postavljanjem elektroničkih ograda R1 za adherentne stanice i R2 za CD14⁺ stanice. Na oglednim histogramima vidi se da CD14⁺ stanice decidue (Slika 10A) i periferne krvi (Slika 10B) ne izražavaju CCR7. To je u skladu s rezultatima dobivenim u preostalim 8 pokusa gdje je izražaj CCR7 bio $\geq 1\%$ i nije se međusobno statistički značajno razlikovao (Slika 10C). Međutim 62,42% decidualnih CD14⁺ stanica izražava CCR5 u odnosu na kontrolno obilježavanje (Slika 3A), dok CCR5 nije izražen na CD14⁺ stanicama periferne krvi (Slika 10B). Analizom rezultata u 9 učinjenih pokusa dobivena je statistička značajnost na razini $p=0.009$ između

izražaja CCR5 na decidualnim CD14⁺ stanicama (31,36 %; 6,4-51,6%) i CD14⁺ stanicama periferne krvi (0%, Slika 10C).



Slika 9. Ogledni primjer analize izraženosti površinskih biljega CD1a i CD83 na CD14⁺ stanicama periferne krvi prvog tromjesečja zdrave trudnoće. Način postavljanja elektroničke ograde na DMS (R1) te postotak CD14⁺ stanica unutar elektroničke ograde (R2) prikazan je u točkastim grafovima (A). Izražaj CD1a i CD83 biljega na CD14⁺ stanicama periferne krvi prikazuju histogrami (B), dok su vrijednosti središnjeg

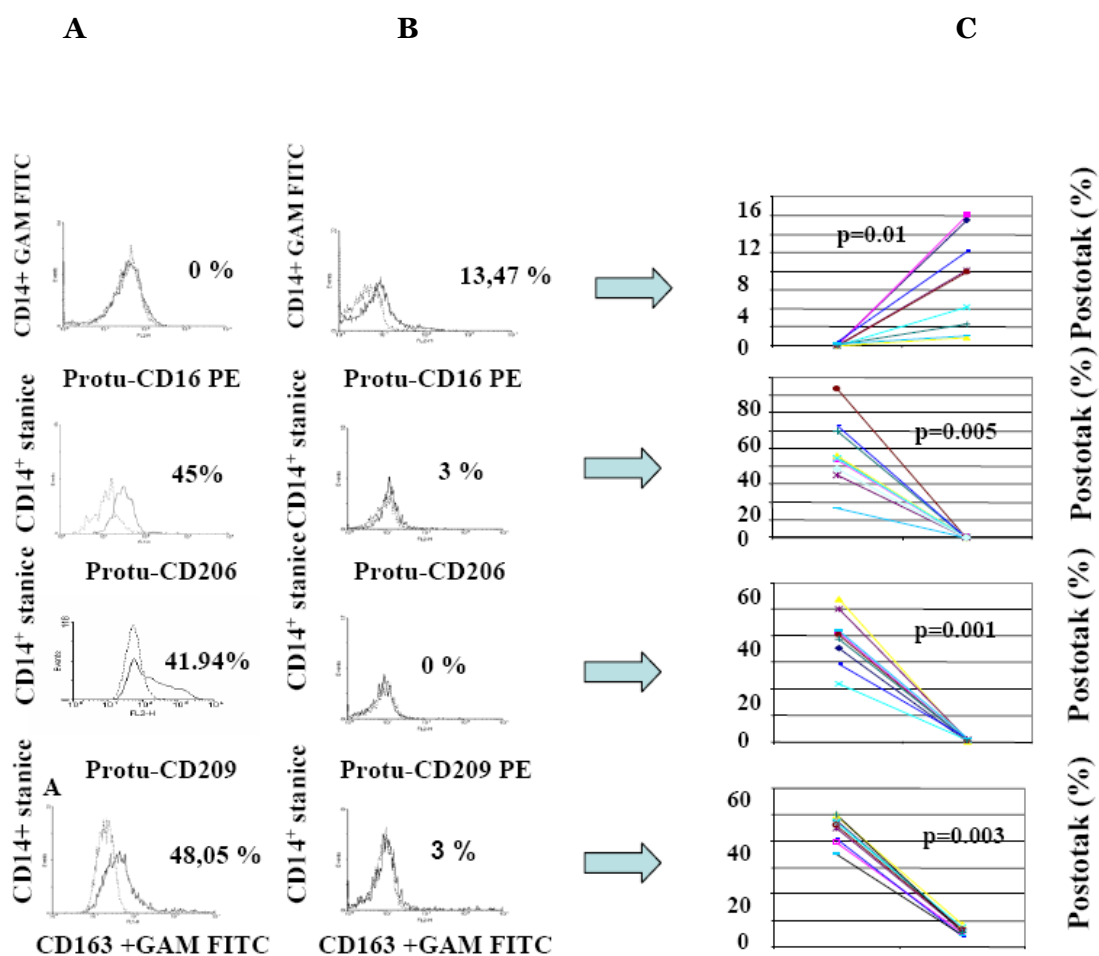
mjesta za navedene biljege dobiveni analizom 9 različitih pokusa prikazani u grafu C.



Slika 10. Ogledni histogrami izraženosti receptora (CCR) 5 i CCR7 za kemokine na CD14⁺ stanicama u decidui rane trudnoće (A) i perifernoj krvi trudnih žena (B). Graf C prikazuje rezultate dobivene u svih 9 odvojenih pokusa.

4.1.4. Fenotipska svojstva decidualnih CD14⁺ stanica u odnosu na CD14⁺ stanice periferne krvi

Kako bismo fenotipski detaljnije odredili fenotip decidualnih CD14⁺ stanica te odredili razlike prema fenotipu monocita periferne krvi trudnih žena koristili smo se metodom direktne imunofluorescencije pri čemu je ispitivana izraženost biljega CD16, CD206, CD209 i CD163. Postavljanjem elektroničke ograde (R1) na DMS ili mononuklearne stanice periferne krvi, određivali smo udio CD14⁺ stanica u R2 na način prikazan i opisan u slikama 1 i 2. Analizirali smo zastupljenost CD16, CD206, CD209 i CD163 na površini CD14⁺ stanica koje pripadaju elektroničkoj ogradi R1 i R2. Primjer analize je prikazan pomoću pripadajućih histograma. Iz Slike 11A vidljivo je da decidualne CD14⁺ stanice ne izražavaju biljeg CD16 dok 13,47% CD14⁺ stanica periferne krvi izražava ovaj biljeg (puna krivulja histograma) u odnosu na obilježavanje protutijelom istog podrazreda, irelevantne specifičnosti (iscrtkana krivulja histograma) (Slika 11B). To je statistički značajna razlika na razini značajnosti $p < 0.01$ dobivena analizom u 9 odvojenih pokusa prikazanih na Slici 11C 45% decidualnih CD14⁺ stanica izražava CD206 na svojoj površini (Slika 11A), što je statistički značajno više od CD14⁺ stanica periferne krvi koje izražavaju 3% CD206 u prikazanom primjeru (Slika 11B, $p = 0.005$). Biljeg CD209 prisutan je kod 41,49% decidualnih CD14⁺ stanica (Slika 11A), dok CD14⁺ stanice periferne krvi trudnih žena ne izražavaju ovaj biljeg (slika 4B), što je statistički značajna razlika ($p = 0.001$) uočena u 9 učinjenih pokusa (Slika 11C). Slika 11A pokazuje da 48,05% decidualnih CD14⁺ stanica izražava CD163, što je statistički značajno više od CD14⁺ stanica periferne krvi ($p = 0,03$, Slika 4C) koje izražavaju ovaj biljeg na samo 3% stanica (Slika 11B).



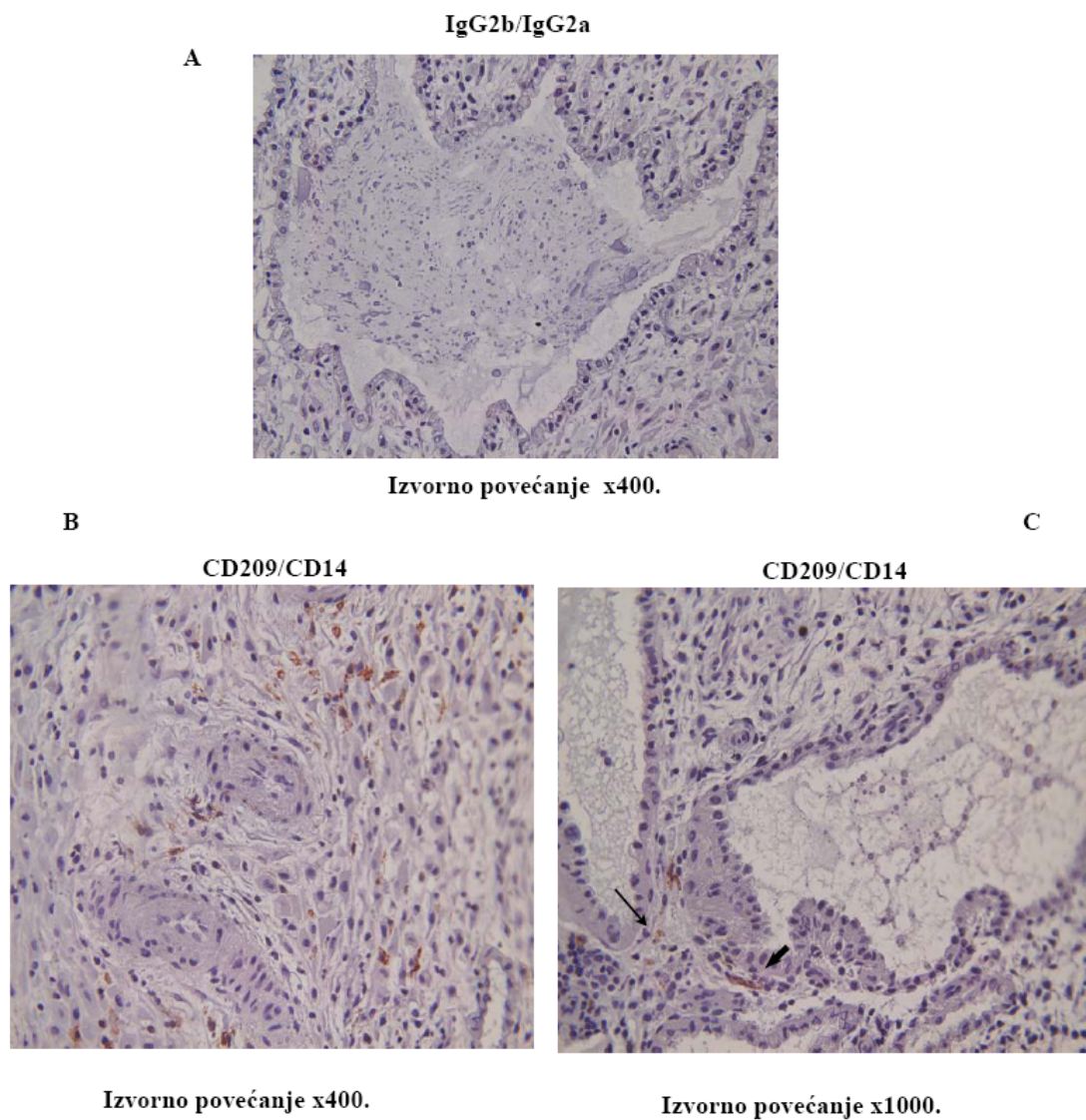
Slika 11. Histogrami prikazuju ogledni primjer izraženosti površinskih biljega CD16, CD206, CD209 i CD163 na decidualnim CD14+ stanica rane trudnoće (A) i CD14+ stanica periferne krvi trudnih žena (B). Rezultati dobiveni u svih 9 pokusa prikazani su na grafu C.

4.2. Utvrđivanje prisustva CD14⁺/CD209⁺ u decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne trudnoće

4.2.1. Smještaj dvostruko pozitivnih CD14⁺CD209⁺ stanice u decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne trudnoće

Kako bismo in vivo potvrdili prisustvo i raspodjelu decidualnih CD14⁺ stanica koje izražavaju CD209 na svojoj površini tijekom prvog tromjesečja trudnoće, metodom imunohistokemije smo na parafinskim serijskim rezovima bazalnog sloja decidue obilježili stanice koje izražavaju ova dva biljega. Na Slici 12 CD209⁺ stanice obilježene su sa Permanent red kromogen, a CD14⁺ stanice s DAB (3,3-diaminobenzidin) kromogenom. Dvostruko pozitivne stanice obilježene su kratkom strelicom, a CD14⁺ stanice s dugom strelicom te je uočljiva obilna zastupljenost CD14⁺/CD209⁺ stanica u decidualnom tkivu prvog tromjesečja trudnoće. Dvostruko pozitivne stanice se u najvećem broju nalaze u neposrednoj blizini žlijezda u decidualnom tkivu.

Slika 12A pokazuje tkivne rezove bazalnog sloja decidue obilježene mišjim protu-humanim IgG1/IgG2a protutijelima kao izotipska kontrola te mišjim protu-humanim protu CD14 protutijelima i protu-humanim protu CD209 monoklonskim protutijelima (Slika 12B i 12C). Osnovno uvećanje je 400x. Slika 12C pokazuje uvećanje uokvirenog segmenta tkivnog reza sa Slike 12B (osnovno uvećanje 1000x).

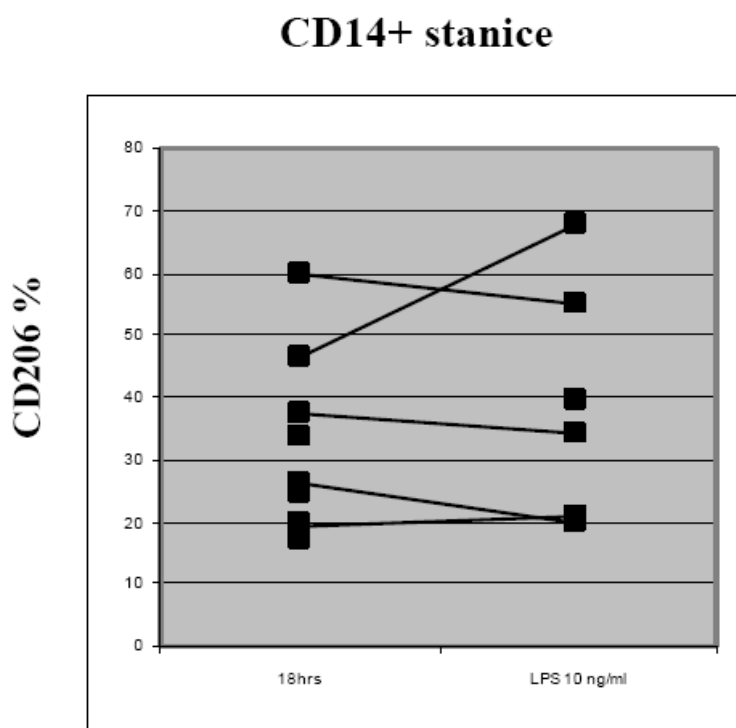


Slika 12. Imunohistokemijsko obilježavanje serijskih rezova bazalnog sloja decidue prvog tromjesečja trudnoće uklopljenih u parafin pomoću protu-CD14 protutijela i mišjeg IgG1/IgG2a protutijela (A) ili protu-CD209 protutijela pri povećanju 400x (B) i 1000x (C).

4.3. Fenotipska i funkcijska obilježja decidualnih CD14⁺ stanica prvog tromjesječja normalne trudnoće nakon stimulacije lipopolisaharidom

4.3.1. Izražaj CD206 na decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće nakon stimulacije s lipopolisaharidom

Indirektnom imunoflorescencijom obilježavali smo uzorke DMS inkubiranih prethodnih 18 sati s 10 ng/kg LPS ili samo u mediju za kulturu stanica te analizirali na protočnom citometru. Rezultati su izraženi kao postotak CD14⁺ stanica koje izražavaju biljeg CD206 na površini (Slika 13). Na osnovi 9 izvedenih pokusa vidi se da 37,46% (51,03,-119,66) CD14⁺ stanice kultiviranih u mediju izražava CD206, dok 39,52% (17,96,-46,59%) CD14⁺ stanica kultiviranih s lipopolisaharidom izražava ovaj biljeg. Statističkom analizom nije utvrđena značajna razlika u izražaju CD206 između ovih dviju ispitivanih grupa.



Slika 13. Graf prikazuje utjecaj lipopolisaharida na izraženost CD206 biljega na površini CD14⁺ stanica u 9 odvojenih pokusa

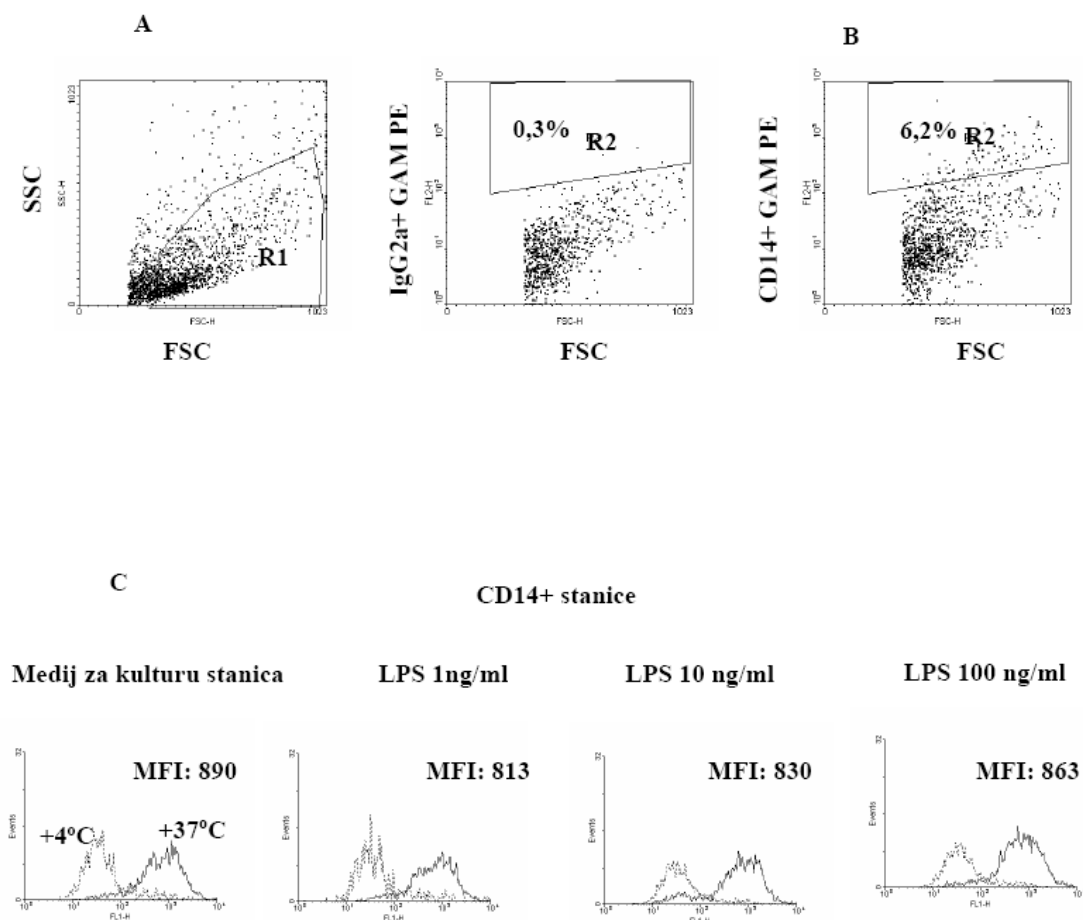
4.3.2. Utjecaj lipopolisaharida na endocitozu FITC-dextrana u decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće

Na Slici 14 prikazana je endocitoza FITC-dekstrana na CD14⁺ stanicama iz suspenzije DMS kultiviranih in vitro samo u mediju za kulturu stanica ili u prisustvu rastućih koncentracija lipopolisaharida (1 ng/ml, 10 ng/ml i 100 ng/ml). Rezultati su analizirani na protočnom citometru i prikazani u točkastim grafovima i histogramima. U točkastom grafu R1 elektroničku ogradu postavili smo na DMS i odredili postotak CD14⁺ stanica koji u oglednom primjeru iznosi 6,2% u odnosu na kontrolnu vrijednost obilježavanja izotipskim protutijelom (0,3%, Slika 14A), a nalazi se unutar R2 ograde. Unutar R1 i R2 elektroničke ograde analizirali smo endocitozu FITC-dekstrana u nestimuliranim i stimuliranim CD14⁺ stanicama (Slika 14B). Rezultati internalizacije izraženi su u histogramu kao razlike u MFI za FITC dekstran na 37° C (puna krivulja) i na +4° C (isprekidana krivulja) za svaku pojedinu stimulaciju. Dodatak lipopolisaharida u rastućim koncentracijama nije mogao smanjiti endocitozu FITC-dekstrana u prikazanom pokusu, pri čemu je razlika u MFI pri 37°C i 4°C za stanice koje su inkubirane 4 sata u mediju 889,89, za stanice stimulirane s 1 ng/ml lipopolisaharida 813,2, s 10 ng/ml 830,3, a sa 100 ng/ml 862,9. Ponavljanjem pokusa u dodatnih 5 različitih uzoraka dobili smo istovjetne rezultate, a analizom nismo utvrdili statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa.

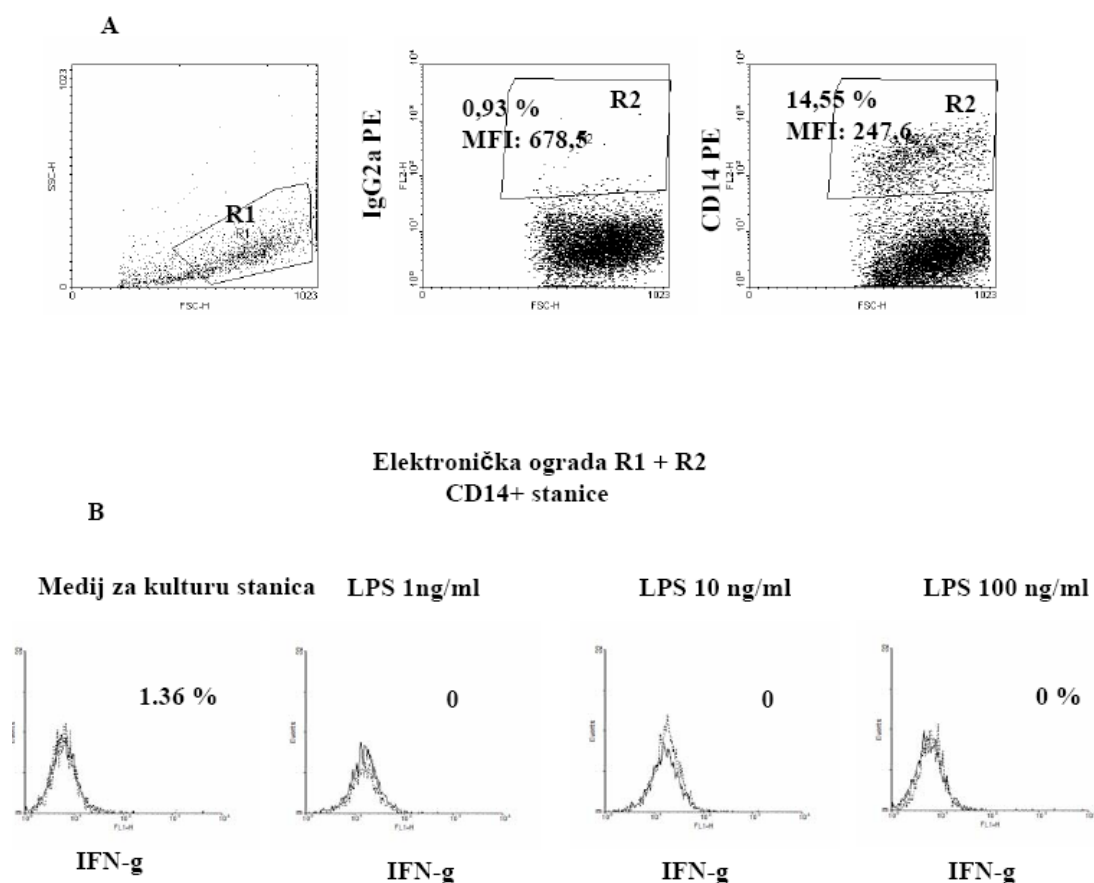
4.3.3. Stvaranje IFN- γ u decidualnim CD14⁺ stanicama nakon stimulacije lipopolisaharidom

Decidulane mononuklearne stanice inkubirali smo 4 sata samo u mediju za kulturu stanica ili s rastućim koncentracijama lipopolisaharida (1 ng/ml, 10 ng/ml i 100 ng/ml, Slika 8). Tako stimulirane stanice obilježavali smo metodom direktne imunofluorescencije pomoću anti-CD14 i anti-IFN- γ protutijela. Protočnim citometrom postavili smo elektroničku ogradu R1 na DMS i odredili postotak CD14

stanica (14,55%) obuhvaćenih u R2 elektroničkoj ogradi u odnosu na kontrolno obilježavanje (0,93%, Slika 15A). Unutar elektroničkih ograda R1 i R2 analizirali smo izraženost IFN- γ . Na histogramima prikazane su IFN- γ ⁺ stanice punom krivuljom, a izotipska kontrola isprekidanom krivuljom. Izražaj IFN- γ u citoplazmi decidualnih CD14⁺ stanica je oko 1% i ne može se povećati stimulacijom s rastućom koncentracijom lipopolisaharida što prikazuju histogrami s 0% IFN- γ ⁺ stanica (Slika 15B).



Slika 14. Ogledni primjer analize endocitoze FITC-dekstrana u CD14⁺ stanicama nakon stimulacije s rastućim koncentracijama lipopolisaharida. Način postavljanja elektroničke ograde na DMS (R1) te postotak CD14⁺ stanica unutar elektroničke ograde (R2) prikazan je u točkastim grafovima (A). Histogrami pokazuju razliku u MFI za FITC dekstran na 37° C (puna krivulja) i na +4° C (isprekidana krivulja) za svaku pojedinu stimulaciju.

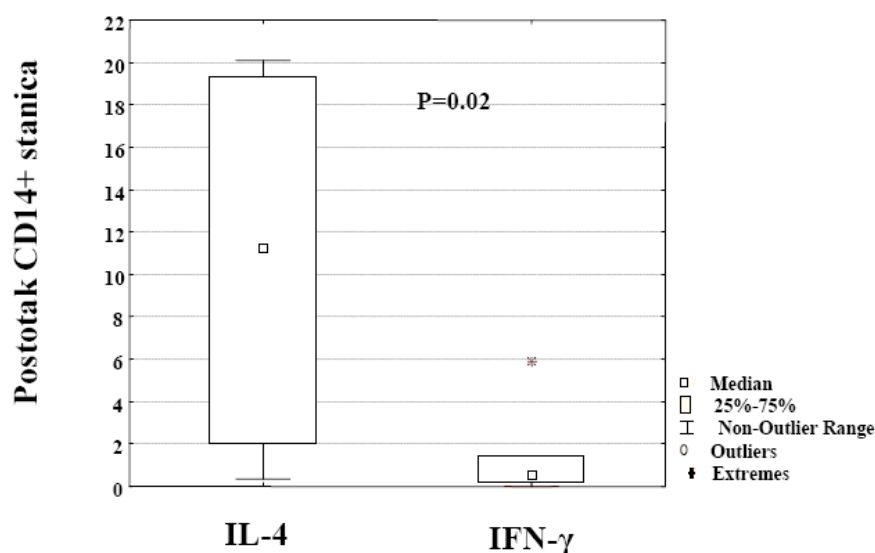


Slika 15. Ogledni primjer analize lučenja interferona- γ u nestimuliranim i lipopolisaharidom stimuliranim CD14+ stanicama. Način postavljanja elektroničke ograde na DMS (R1) te postotak CD14+ stanica unutar elektroničke ograde (R2) prikazan je u točkastim grafovima (A). Histogrami pokazuju postotak IFN- γ + stanica (puna krivulja) u usporedbi s izotipskom kontrolom (isprekidana krivulja) za svaku pojedinu stimulaciju (B).

4.4. Stvaranje citokina i kemokina u decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja normalne trudnoće

4.4.1. Stvaranje IL-4 i IFN- γ u decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće.

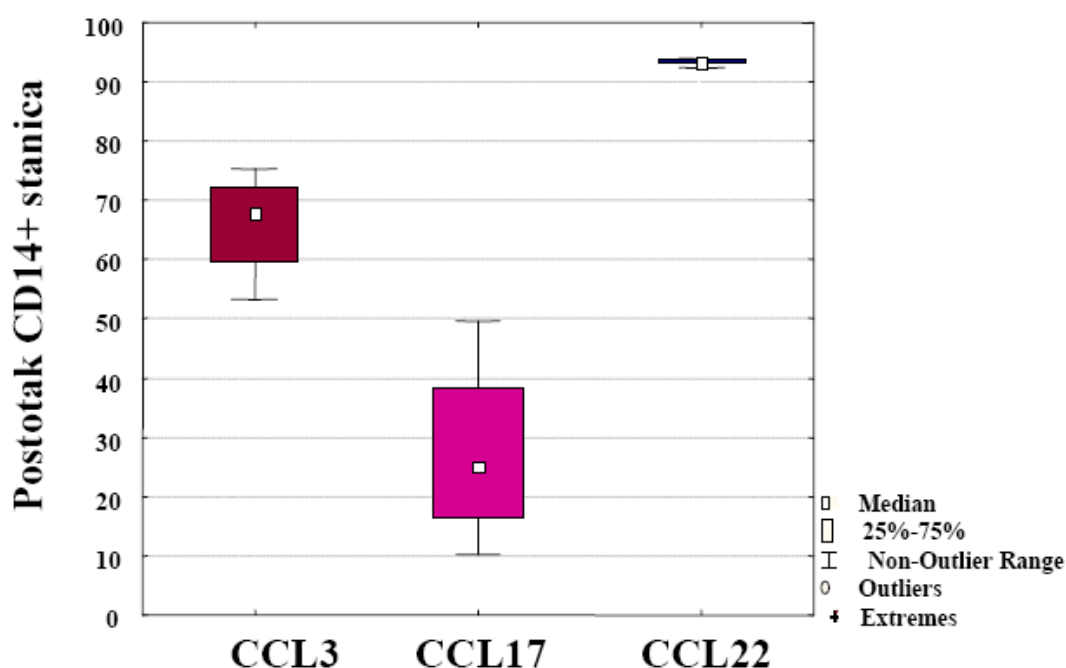
M1 i M2 makrofagi razlikuju se osim u fenotipu i u vrsti citokina koje luče. Tako M1 luče znatno više IFN- γ , dok M2 luče više IL-4. Kako bismo utvrdili koje citokine prvenstveno luče decidualne CD14⁺ stanice koristili smo se metodom indirektna i direktna imunofluorescencije pri čemu su svježe izdvojene DMS dvostruko obilježavane s protu-CD14 protutijelom za površinski biljeg i s protu-IL-4 ili protu-IFN- γ za unutarstanične biljege. Protutijela istog podrazreda korištena su kao kontrola. Rezultati su izraženi kao postotak CD14⁺ stanica koje stvaraju pojedine citokine u odnosu na obilježavanje kontrolnim protutijelom. Citokin IL-4 stvara od 2-20% CD14⁺ stanica, dok u prosjeku manje od 2% ovih stanica stvara IFN- γ (Slika 16). Decidualne CD14⁺ stanice stvaraju statistički značajno više IL-4 nego IFN- γ , pri čemu je razina statističke značajnosti $p=0.02$ izračunata temeljem 6 neovisnih pokusa.



Slika 16. Graf prikazuje lučenja protu-upalnog citokina, IL-4 i protu-upalnog citokina IFN- γ u decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće dobivenih u 6 neovisnih pokusa.

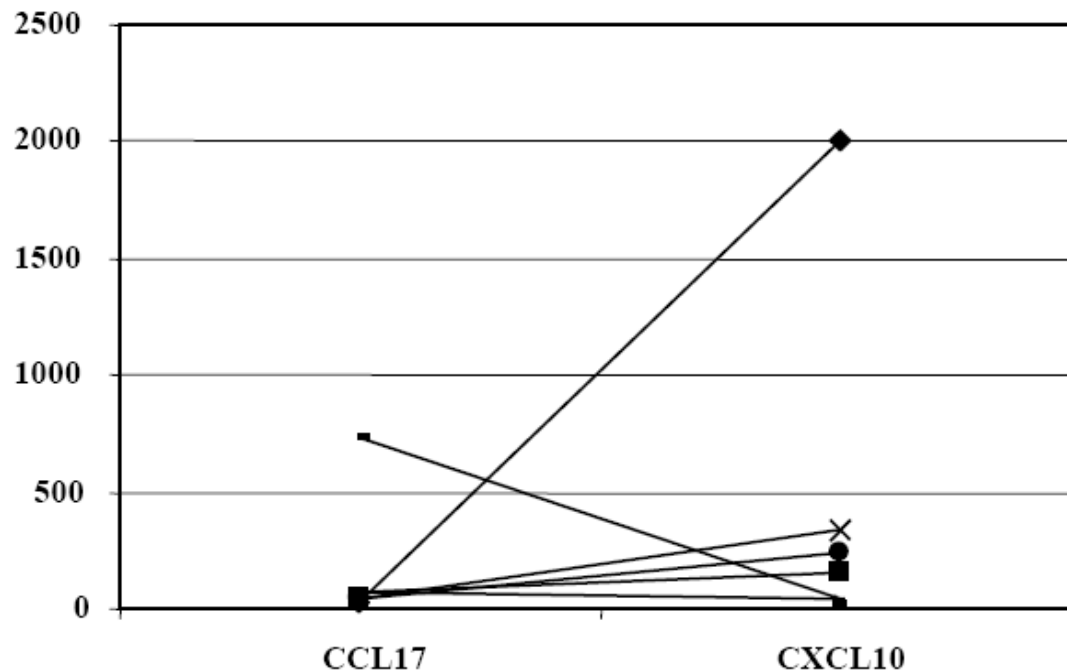
4.4.2. Stvaranje i lučenje kemokina u decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće

Metodom direktne florescencije na svježe izdvojenim DMS koje su obilježene s protu-CD14 protutijelima određivali smo izraženosti pro-upalnog CCL3 te protu-upalnih CCL17 i CCL22 kemokina. Rezultati su izraženi kao postotak CD14⁺ stanica koje izražavaju pojedine biljege u usporedbi s kontrolnim obilježavanjem protutijelom istog podrazreda, ali irelevantne specifičnosti. Kemokin CCL3 prosječno stvara 60-70% decidualnih CD14⁺ stanica, oko 20-40% CD14⁺ stanica stvara CCL17, a gotovo sve (95%) stvaraju CCL22 (Slika 17). Stvaranje CCL22 u decidualnim CD14⁺ stanicama statistički je značajno više ($p=0.049$) u odnosu na stvaranje CCL3 i CCL17 (Slika 17).



Slika 17. Graf pokazuje postotak nestimuliranih decidualnih CD14⁺ stanica koje stvaraju protu-upalne kemokine CCL22 i CCL17 i pro-upalni kemokin CCL3.

Stvaranje protu-upalnog kemokina CCL17 i pro-upalnog CXCL10 kemokina određivali smo u nadtalozima CD14⁺ stanica obogaćenih magnetskim pročišćavanjem ELISA metodama. Slika 18. pokazuje da je lučenje oba citokina podjednako te nema statistički značajne razlike temeljeno na izvedenih 6 odvojenih pokusa.



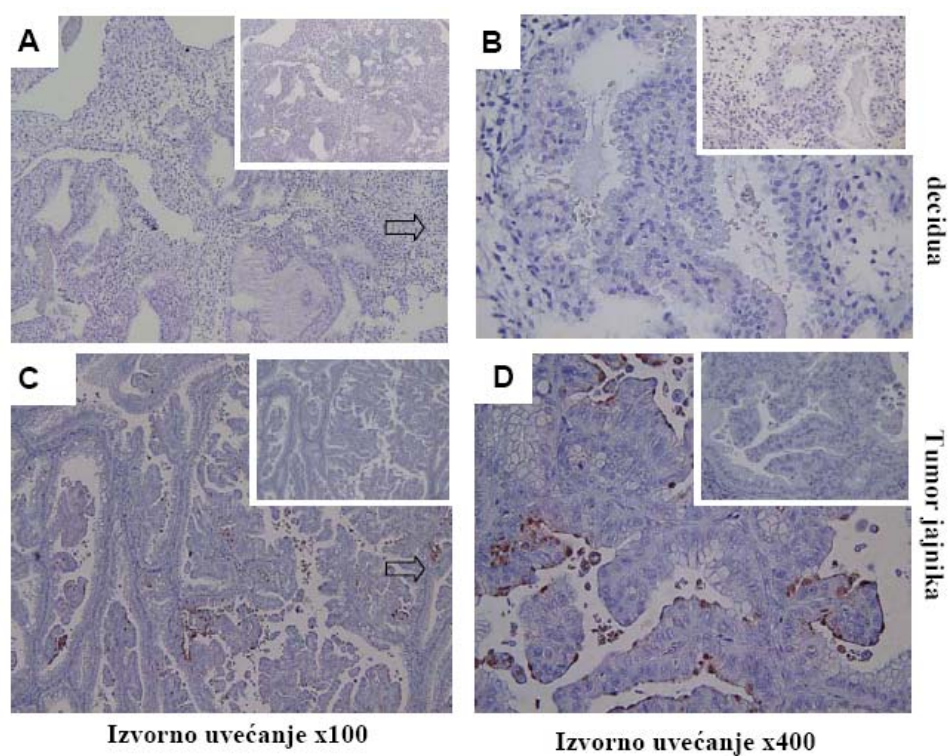
Slika 18. Graf pokazuje koncentraciju izlučenih kemokina CCL17 i CXCL10 u nadtalogu nestimuliranih decidualnim CD14⁺ stanica prvog tromjesečja trudnoće obogaćenih magnetskim izdvajanjem.

4.5. Prisustvo MUC1 na majčino-fetalnom spoju prvog tromjesečja normalne trudnoće

4.5.1. Izraženost MUC1 u decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne trudnoće

Kako bismo in vivo istražili moguće prisustvo MUC1 u decidui prvog tromjesečja trudnoće koristili smo se imunohistokemijom na rezovima bazalnog sloja decidue uklopnjene u parafin, dok je tkivo mucinoznog tumora ovarija korišteno kao pozitivna kontrola. Za obilježavanje MUC1 koristili smo monoklonska protutijela usmjerena prema Tn (N-acetylgalactosamine- α 1-O-ser/thr) epitopu MUC1 molekule. Na slici 19. prikazana je imunohistokemija decidualnog tkiva prvog tromjesečja normalne trudnoće (A, B) i tkiva mucinoznog tumora ovarija (C, D). MUC1 pozitivne stanice prikazane su kao smeđe obojene stanice pomoću 3,3-diaminobenzidina (DAB) u izvornom povećanju 100x (A) i 400x (B). Umetnute slike u gornjem dijelu prikazuju obilježavanje s IgG1 irelevantnim protutijelima.

MUC1 nismo utvrdili u decidualnom tkivu prvog tromjesečja trudnoće tijekom obilježavanja 5 različitih uzoraka tkiva, dok je svaki put tijekom procesa obilježavanja bio dokazan u rezovima mucinoznog tumora ovarija (Slika 19C i 19D u izvornom povećanju 100x, odnosno 400x).



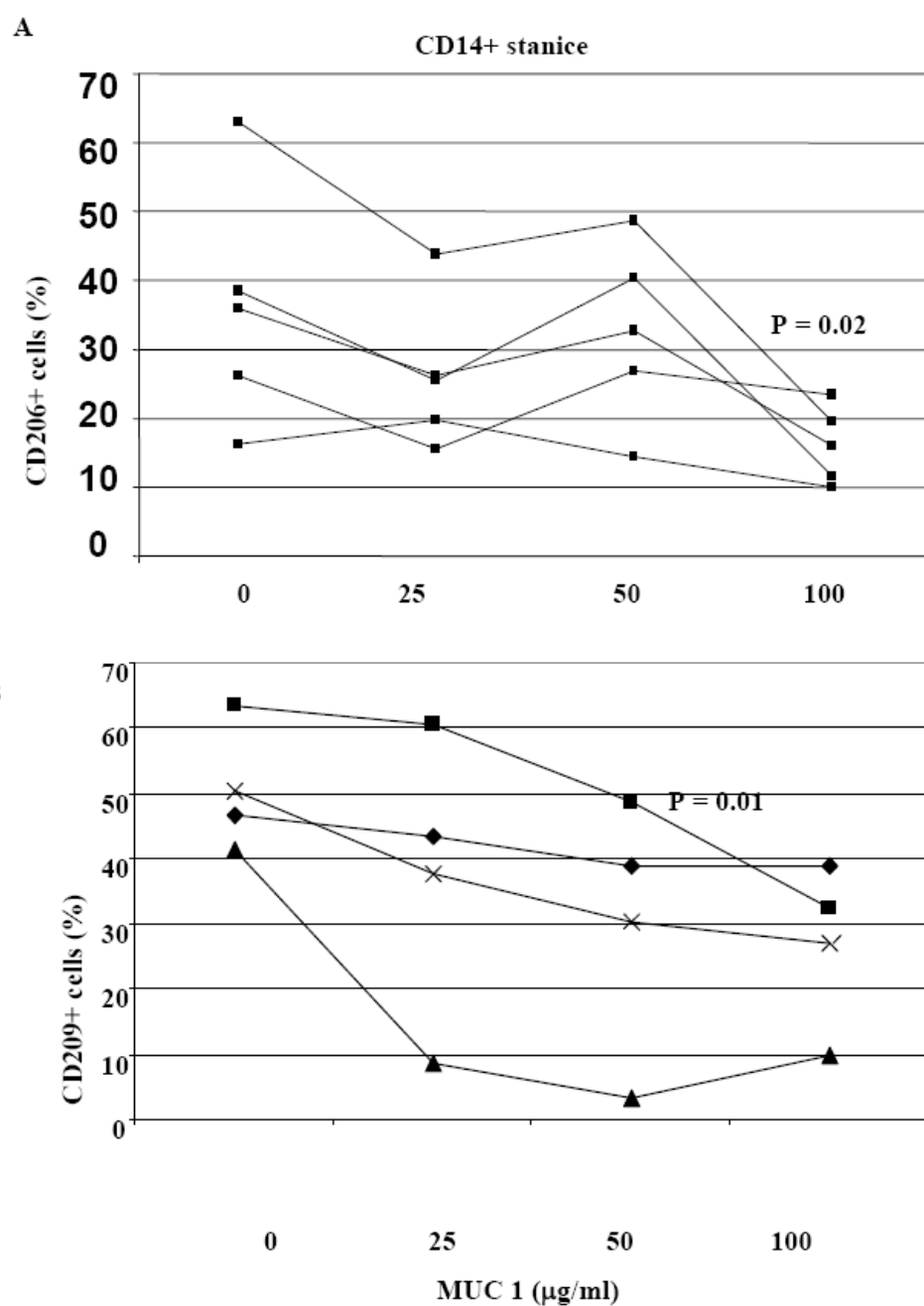
Slika 19. Imunohistokemijsko obilježavanje anti-Tn (N-acetylgalactosamine- α 1-O-ser/thr) monoklonskim protutijelom u rezovima bazalnog sloja decidue prvog tromjesečja trudnoće pri povećanju 100x (A) i 400x (B) i tumora jajnika pri povećanju 100 x(C) i 400 x (D).

4.6. Utjecaj MUC1 na decidualne CD14⁺ stanice prvog tromjesečja normalne trudnoće

4.6.1. Vezanje i internalizacija MUC1 za domenu za prepoznavanje ugljikohidrata na CD206 i CD209 receptorima decidualnih CD14⁺ stanica prvog tromjesečja trudnoće

Svježe izdvojene DMS kultivirali smo samo u mediju za kulturu stanica ili smo im ponudili MUC1 u različitim koncentracijama (25, 50, 100 µg/ml) kroz 30 minuta na ledu kako bismo utvrdili moguće vezanje MUC1 za površinu CD14⁺ stanica. U tu svrhu naknadno smo uzorke stanica dvostruko obilježili s protu-CD14 protutijelom i protutijelima usmjerenim ka specifičnoj domeni za prepoznavanje ugljikohidrata koja je sastavni dio CD206 tj. CD209 receptora uz pomoć PAM-1 protu-CD206, odnosno DCN46 protu-CD209 protutijela. Rezultati su izraženi kao postotak CD14⁺ stanica koje izražavaju CD206 (Slika 20A) ili CD209 (Slika 20B) u usporedbi s izotipskom kontrolom (IgG1 odnosno IgG2b). MUC1 smanjuje vezanje PAM-1 monoklonskog protutijela za domenu za prepoznavanje ugljikohidrata na CD206 receptor na način ovisan o koncentraciji. Statistička značajnost od $p=0.019$ utvrđena je kada je izraženost CD206 biljega na decidualne CD14⁺ stanice iz uzorka stimuliranog sa 100 µg/ml (16,10% /11,52,-19,56%) uspoređen sa stanicama koje su kultivirane samo u mediju, 35,98% (26,18,-38,45%) dobivenih u 5 različitih pokusa (Slika 20A).

Iz slike 20B vidi se da decidualne CD14⁺ stanice rane trudnoće stimulirane s rastućim koncentracijama MUC1 pokazuju smanjeno vezanje protu-CD209 monoklonskog protutijela za domenu za prepoznavanje ugljikohidrata na CD209 receptoru na način ovisan o koncentraciji. Statistička značajnost na razini $p=0.01$ utvrđena je kada su CD209⁺ decidualne CD14⁺ stanice stimulirane sa 100 µg/ml MUC1 (33,72%, 18,56.-48,89) uspoređene s nestimuliranim stanicama koje izražavaju 50,5% (43,94,-57,06%) CD209 izračunato iz 4 učinjena pokusa.



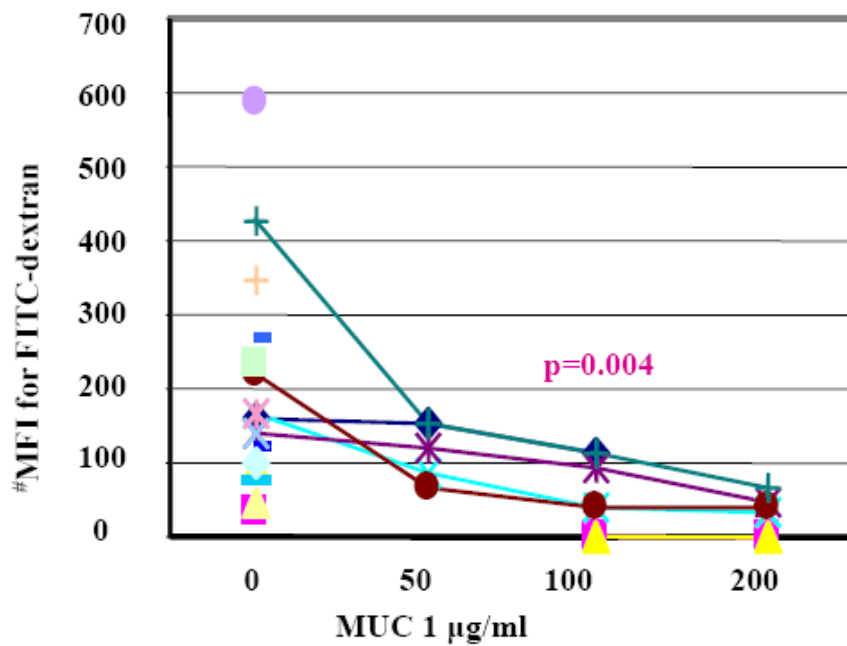
Slika 20. Prikaz izraženosti CD206 (A) i CD209 (B) na decidualnim CD14+ stanicama prvog tromjesečja trudnoće inkubiranih u mediju ili s rastućim koncentracijama MUC1 (25, 50, 100 μg/ml).

4.6.2. Utjecaj MUC1 na ulazak FITC dekstrana u decidualne CD14⁺ prvog tromjesečja trudnoće

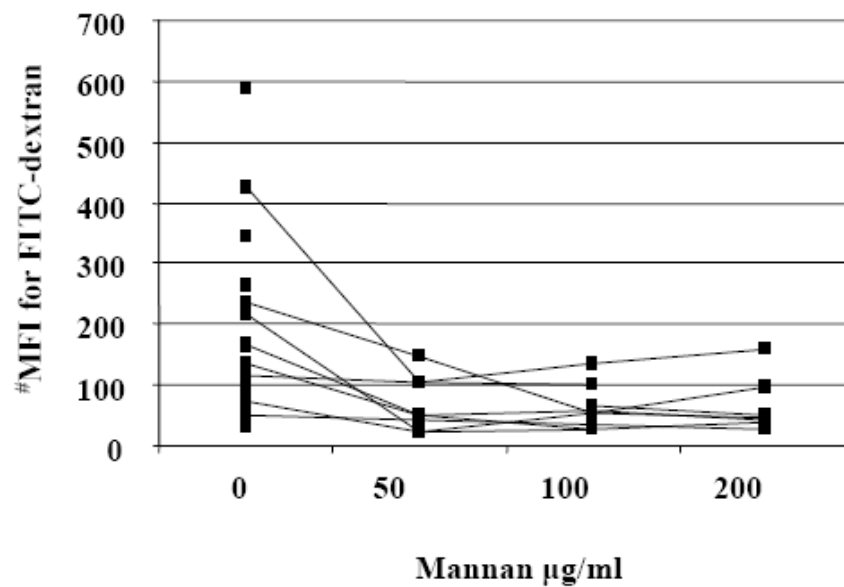
Stanice prvog tromjesečja trudnoće Decidualne mononuklearne stanice kultivirali smo 30 minuta na ledu s rastućim koncentracijama MUC1 (50, 100 i 200 µg/ml) (Slika 21A) ili mannana (50, 100, 200 µg/ml, Slika 21B), a nakon toga smo im ponudili FITC dekstran za internalizaciju. Rezultati su izraženi kao MFI za FITC-dekstran u CD14⁺ stanicama koje su kultivirane na 37°C umanjen za vrijednost MFI za FITC dekstran u stanicama kultiviranim na ledu koje su služile kao kontrola, jer je internalizacija na ledu svedena na najmanju mogući mjeru. CD14⁺ stanice iz suspenzije DMS kultiviranih s rastućim koncentracijama MUC1 internaliziraju manje učinkovito FITC-dekstran za kojeg se zna da ulazi u stanicu putem domene za vezanje ugljikohidrata. Učinak je bio ovisan o koncentraciji i statistički značajno smanjenje na razini značajnosti $p=0,004$ nađena je kada se MFI za FITC dekstran nestimuliranih stanica (164; 97,46,-235) usporedio sa stanicama koje su bile stimulirane s 200µg/ml (35; 0,-44,23) MUC1.

Makrofagi iz svježe izdvojenih DMS stimulirani 30 minuta s rastućom koncentracijom mannana također internaliziraju FITC dekstran manje učinkovito (Slika 21B). Učinak je bio ovisan o koncentraciji i statistički značajno smanjenje na razini značajnosti $p=0,007$, $p=0,0023$ i $p=0,0069$ izračunato je kada se MFI za FITC dekstran nestimuliranih stanica usporedio sa stanicama koje su bile stimulirane s 50 µg/ml (58,94; 44,17,-102,66), 100 µg/ml (59,93; 33-133) ili 200µg/ml (48,89; 41,09-98) manana. Obzirom da je mannan ligand za domenu koja veže ugljikohidrate u ovim pokusima smo ga koristili kao pozitivnu kontrolu za internalizaciju MUC1 liganda putem ove domene (Slika 21B).

A



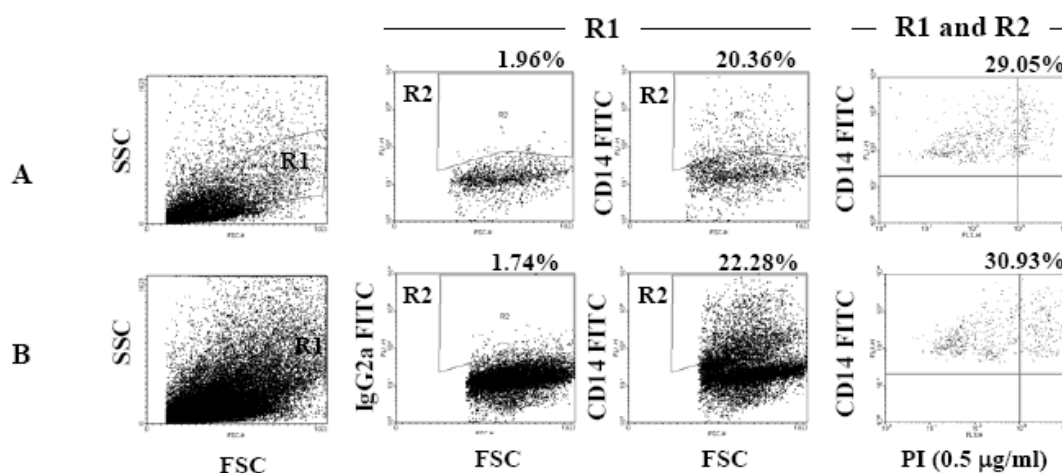
B



Slika 21. Grafovi pokazuju smanjenje ulaska FITC-dekstrana u CD14+ stanice nakon kultivacije s rastućim koncentracijama MUC1 (A) (50, 100 i 200 µg/ml) i mannana (B) (50, 100 i 200 mg/ml).

4.6.3. Fenotipska obilježja decidualnih CD14⁺ stanica stimuliranih s MUC1 in vitro

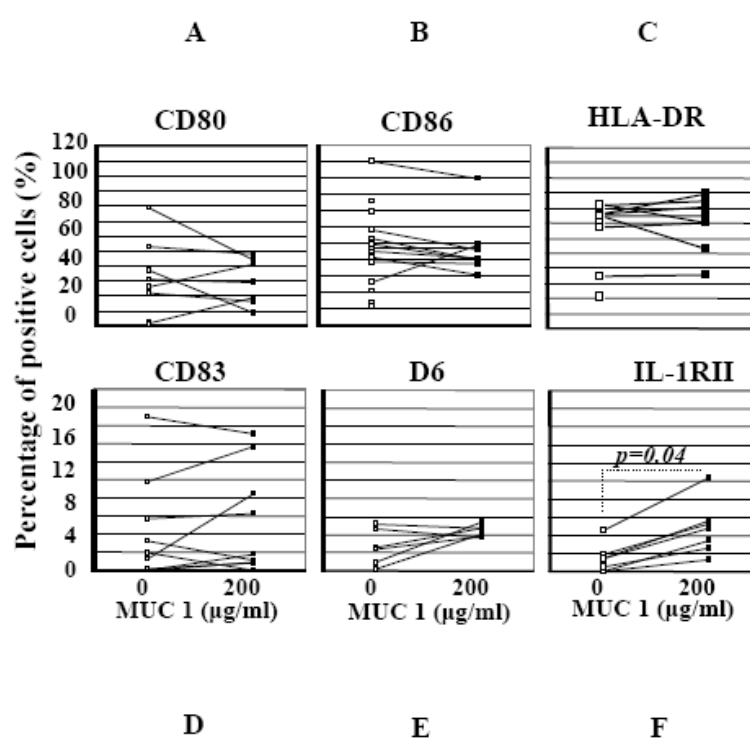
Suspenciju DMS kultivirali smo u mediju za kulturu stanica ili u prisustvu MUC 1 (200 µg/ml) kroz 18 sati. Slika 22 prikazuje vijabilnost nestimuliranih (slika 22A) i stimuliranih (slika 22B) decidualnih CD14⁺ stanica obuhvaćenih elektroničkom ogradom R2 iz populacije ograđenih DMS unutar elektroničke ograde R1 na jednom od 6 učinjenih pokusa. U prikazanom primjeru 20,36% CD14⁺ stanica smo utvrdili u nestimuliranoj suspenziji, a 22,28% u suspenziji stimuliranih stanica u odnosu na kontrolno obilježavanje izotipskim protutijelom koje iznosi 1,96, odnosno 1,74%. Vijabilnost nestimuliranih CD14⁺ stanica iznosilo je 29,05%, a stimuliranih 30,93% prema analizi s propidij jodidom (0,5 µg/ml) na protočnom citometru.



Slika 22. Ogledni primjer vijabilnost nestimuliranih (A) i stimuliranih (B) decidualnih CD14⁺ stanica obuhvaćenih elektroničkom ogradom R2 iz populacije ograđenih DMS unutar elektroničke ograde R1.

Kako bismo utvrdili razliku u fenotipu između ove dvije grupe stanica koristili smo se metodom imunofluorescencije pri čemu su stanice dvostruko obilježene s protu-CD14 monoklonskim protutijelom i protu-CD80, protu-CD86, protu-CD83, protu-HLA-

DR, protu-IL-1RII i protu-D6 monoklonskim protutijelom. Dobivene rezultate analizirali smo na protočnom citometru i prikazali u slici 23. U 7-10 različitih pokusa nismo utvrdili razliku u izražavanju CD80 (A), CD86 (B), HLA-DR (C), CD83 (D) molekula te receptora mamilice D6 (E) nestimuliranih ili stimuliranih decidualnih CD14⁺ stanica u odnosu na izotipsku kontrolu. Utvrdili smo statistički značajno veći postotak IL-1R tip II na decidualnim CD14⁺ stanicama stimuliranim s MUC1 nego u nestimuliranim stanicama ($p=0,004$, Slika 23F).

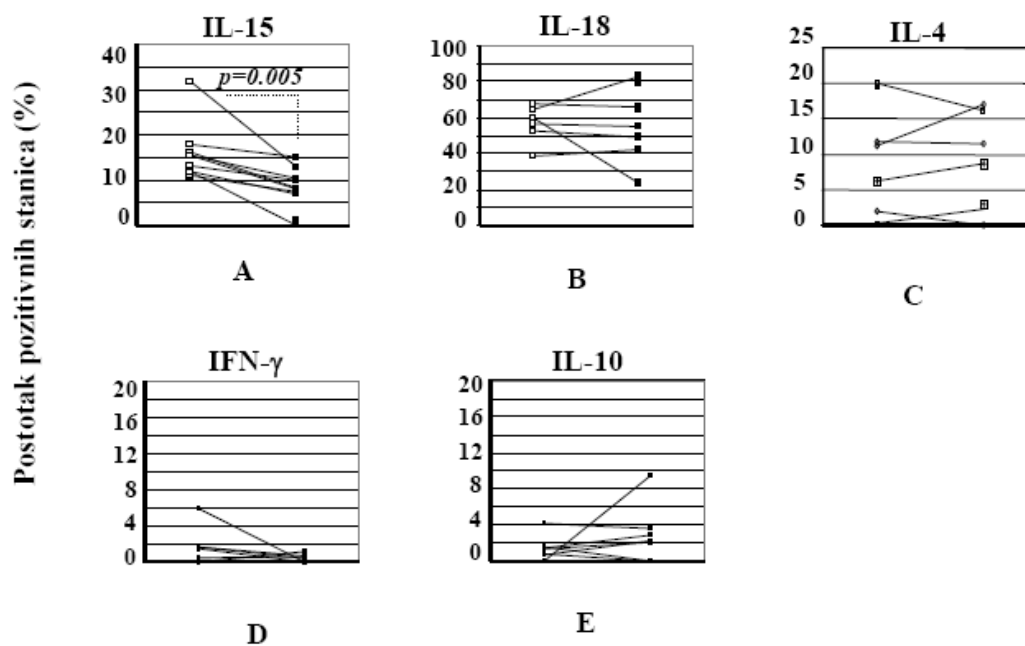


Slika 23. Grafovi prikazuju razliku u fenotipu decidualnih CD14⁺ stanica prvog tromjesečja trudnoće kultiviranih kroz 18 sati u mediju ili u prisustvu MUC1 (200 µg/ml) za površinske antigene CD80 (A), CD86 (B), CD83 (D), HLA-DR (E), D6 (E) i IL-1RII (F).

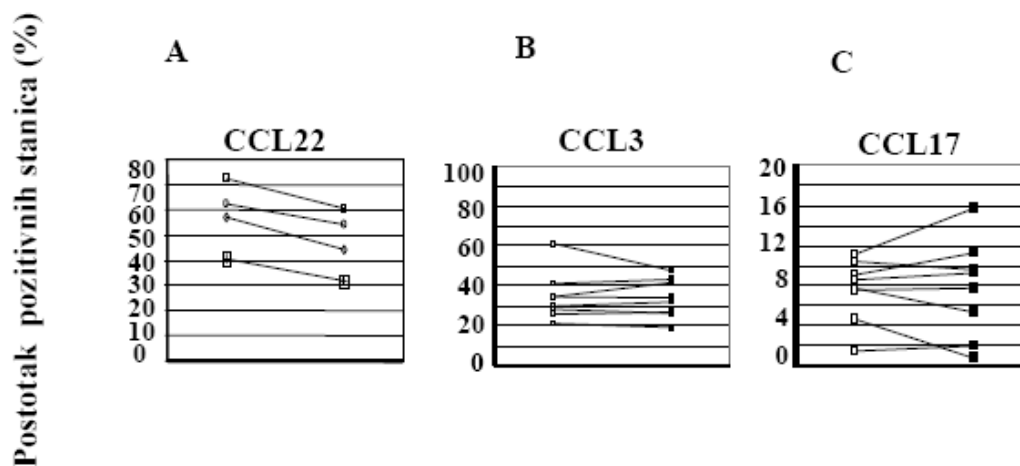
4.6.4. Utjecaj MUC1 na stvaranje citokina i kemokina u decidualnim CD14⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće

Decidualne mononuklearne stanice kultivirali smo kroz 18 sati u mediju ili u prisustvu MUC1 (200 µg/ml). Da bismo utvrdili utjecaj MUC1 na stvaranje pojedinih pro-upalnih i protu-upalnih citokina i kemokina koristili smo se metodom imunoflorescencije tako da smo DMS obilježili prema protokolu za unutarstanično obilježavanje citokina koristeći protutijela protiv IFN-γ, IL-15, IL-4, IL-10 i IL-18 te kemokina CCL3, CCL17 i CCL22, a potom nakon reintegracije stanične membrane stanice smo obilježili s protu-CD14 protutijelom. Dobivene rezultate analizirali smo na protočnom citometru. Rezultati su izraženi kao razlika u postotku CD14⁺ stanica koje izražavaju pojedine biljege u usporedbi s izotipskom kontrolom. Iz slike 24A vidi se da decidualne CD14⁺ stanice u prisustvu MUC1 izražavaju značajno manje IL-15 u usporedbi sa stanicama kultiviranim u mediju. Oko 8% decidualnih CD14⁺ stanica stvara IL-15 u prisustvu makrofaga prethodno stimuliranih s MUC1, dok dvostruko više, tj. oko 16% CD14⁺ stanice kultiviranih u mediju stvara IL-15, a ova razlika u postotku pokazuje statističku značajnost od $p=0.005$ utvrđenu u 9 izvedenih pokusa. IL-18 stvaralo je oko 60% nestimuliranih CD14⁺ stanica (B), dok su vrijednosti IL-4⁺ stanica iznosile do 20% (C), a postotak IFN-γ⁺ i IL-10⁺ stanica bio je najmanji i iznosio je uglavnom oko 5% (Slika 24D i 24E). Pod utjecajem MUC1 nismo našli statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice (Slika 24).

Postotak stanica koje izražavaju CCL22 u nestimuliranim CD14⁺ stanicama nakon 18 sati kulture samo u mediju iznosio je oko 70% (Slika 25A), CCL3⁺ stanica uglavnom od 20-40% (Slika 25B), a CCL17⁺ stanica oko 15% (Slika 25C) i nije se statistički značajno mijenjao u populaciji ovih stanica stimuliranih s MUC1 (slika 25).



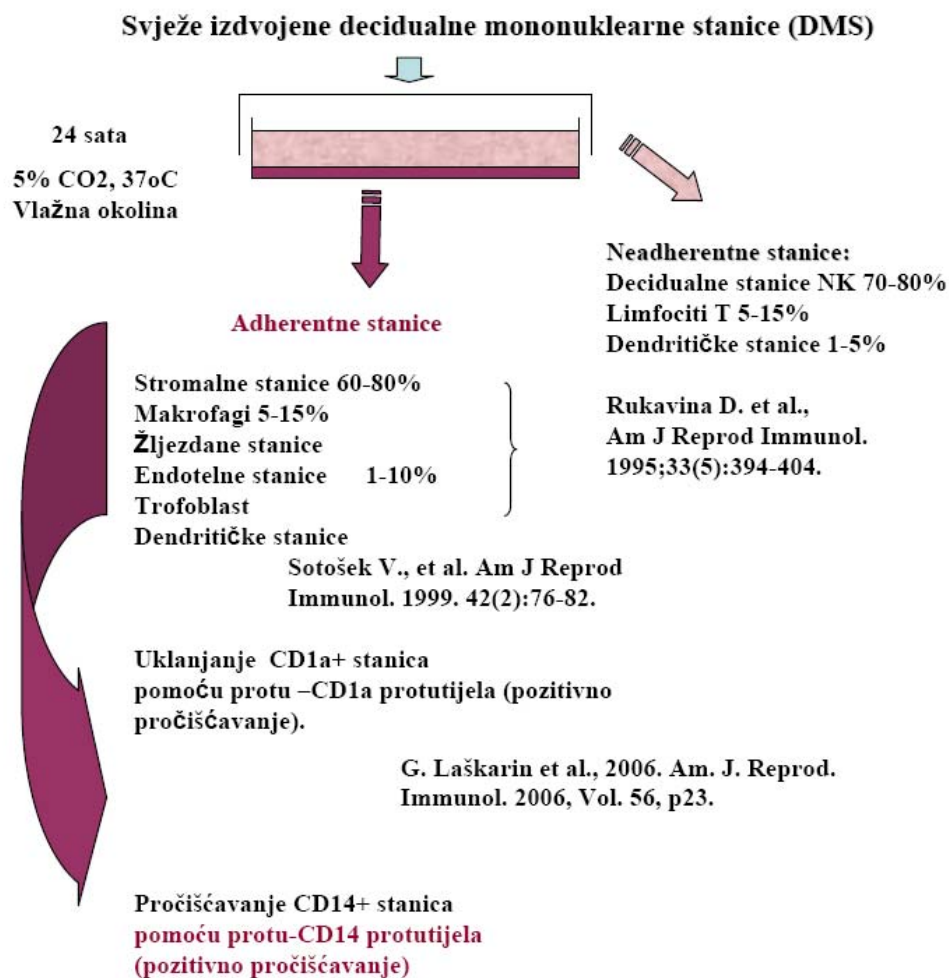
Slika 24. Grafovi prikazuju lučenje citokina u decidualnim CD14+ stanicama kultiviranim kroz 18 sati u mediju ili u prisustvu MUC1 (200 $\mu\text{g/ml}$) za citokine IL-15 (A), IL-18 (B), IL-4 (C), IFN- γ (D) i IL-10 (E).



Slika 25. Grafovi prikazuju lučenje kemokina u decidualnim CD14+ stanicama kultiviranim kroz 18 sati u mediju ili u prisustvu MUC1 (200 $\mu\text{g/ml}$) za kemokine CCL22 (A), CCL3 (B) i CCL17 (C).

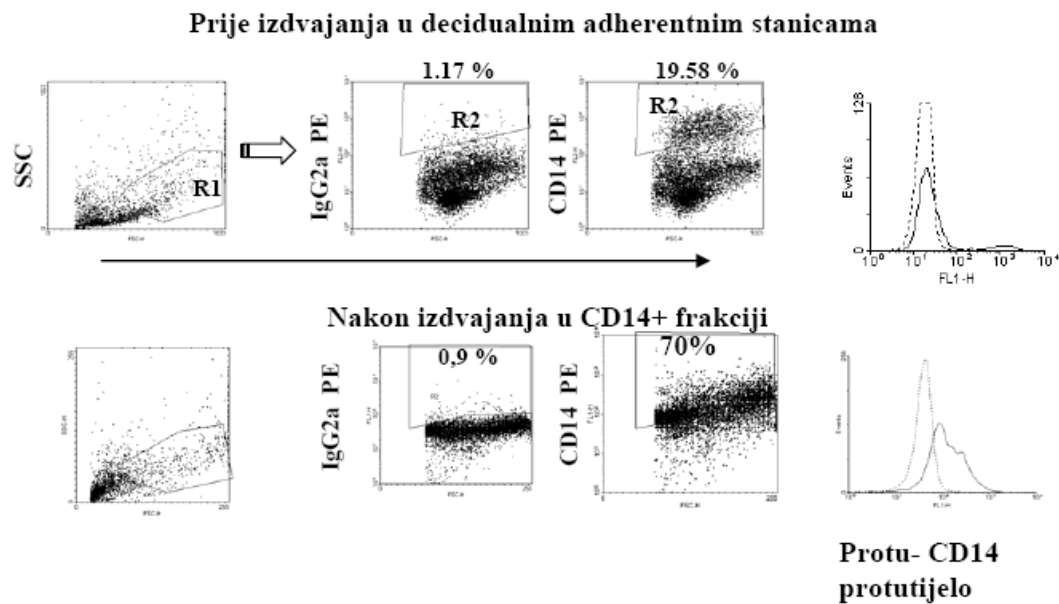
4.7. Uspostavljanje protokola za pročišćavanje decidualnih CD14⁺ stanica iz tkiva

Temeljem naših ranijih istraživanja (61) udjela subpopulacija koje čine DMS, uspostavili smo protokol za izdvajanje decidualnih CD14⁺ stanica iz tkiva. Protokol se sastojao u odvajanju dviju frakcija iz DMS dobivenih enzimatskom razgradnjom tkiva i to adherentne i neadherentne frakcije kultiviranjem DMS u Petrijevoj zdjelici u vlažnoj sredini na 37°C, 5% CO₂ (slika 26). Adherentne stanice sastoje se većinom od stromalnih stanica (60-80%), makrofaga (5-15%) te žljezdanog endotela, trofoblasta i dendritičkih stanica (1-10%). Protokol za izdvajanje obogaćene populacije CD14⁺ stanica iz adherentne populacije stanica polazi od izdvajanja CD1a⁺ dendritičkih stanica pozitivnim magnetskim izdvajanjem, a tek nakon toga CD14⁺ stanice iz CD1a⁺ populacije koristeći protu-CD14 monoklonsko protutijelo obilježeno s magnetskim kuglicama (Slika 26). Ovako izdvojene CD14⁺ stanice u odnosu na kontrolno obilježavanje izotipskim protutijelom koje iznosi 0,9% u prikazanom pokusu pokazuju čistoću od 70% (slika 27). Pročišćena populacija sadrži znatno veći udio CD14⁺ stanica (70%) u odnosu na 19,56% CD14⁺ stanica prisutnih u neadherentnoj frakciji prije izdvajanja (Slika 27). Udio mrtvih CD14⁺ PI⁺ stanica (puni histogram) u usporedbi s PI negativnim stanicama (isprekidani histogram) nakon magnetske separacije iznosi 3.9% (slika 28A). Neadherentnu frakciju sačinjavali su limfociti od kojih stanice NK čine 70-80%, a limfociti T 5-15%, dok su dendritičke stanice predstavljale 1.5%. Iz neadherentne populacije dobili smo decidualne CD56⁺ stanice metodom magnetskog izdvajanja pri čemu smo stanice obilježili protu-CD56 monoklonskim protutijelom konjugirano s magnetskim kuglicama prema protokolu koji je ranije uspostavljen u našem laboratoriju (58) Iz Slike 28B vidi se da je čistoća CD56⁺ stanica nakon magnetske separacije iznosi 95.96% u odnosu na izotipsku kontrolu dok je udio mrtvih PI⁺ (puni histogram) u usporedni s PI⁻ stanicama (isprekidani histogram) 8.9% (slika 28B).

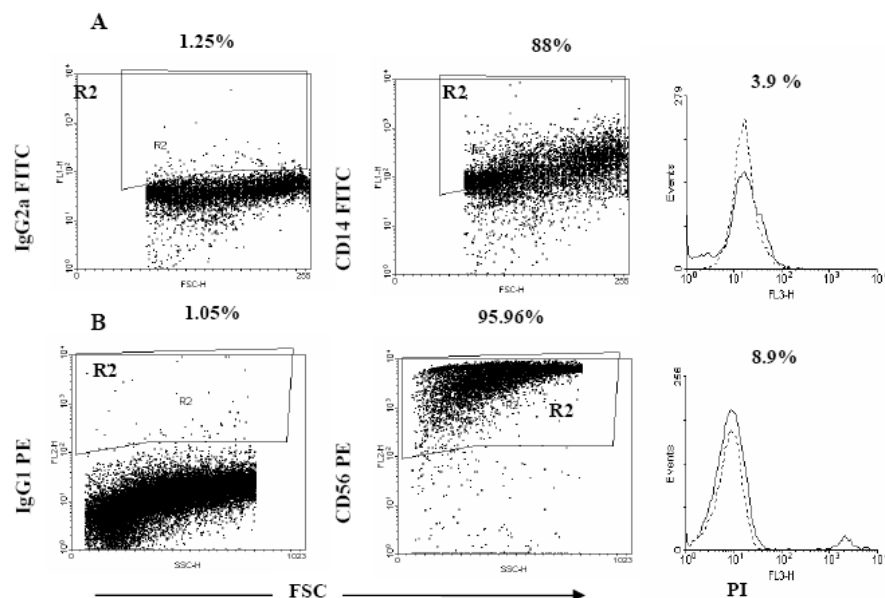


Slika 26. prikazuje protokol za izdvajanje decidualnih CD14+ iz decidualnih adherentnih stanica prvog tromjesečja trudnoće

Čistoća CD14⁺ stanica



Slika 27. Ogledni primjer analize čistoće CD14⁺ stanica nakon izdvajanja pomoću magnetske separacije iz decidualnih adherentnih stanica prvog tromjesečja trudnoće



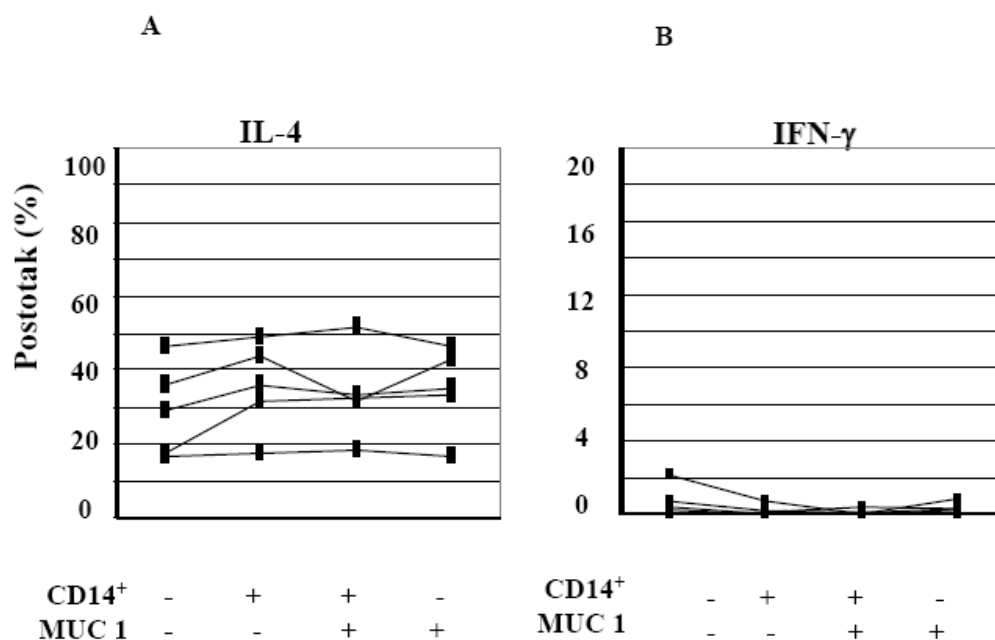
Slika 28. Ogledni primjer analize vijabilnosti CD14⁺(A) i CD56⁺ stanica (B) nakon magnetskog izdvajanja iz decidue prvog tromjesečja trudnoće.

4.8. Međudjelovanje decidualnih CD14⁺ stanica i autolognih decidualnih stanica NK

4.8.1. Utjecaj nestimuliranih i MUC1 stimuliranih decidualnih CD14⁺ stanica na stvaranje citokina u decidualnim CD56⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće in vitro.

Oplemenjenu populaciju decidualnih CD14⁺ stanica koju smo dobili magnetskim izdvajanjem kultivirali smo kroz 5 sati u mediju za kulturu stanica ili u prisustvu MUC1 (200µg/ml) te potom dodali u kulturu s pročišćenim CD56⁺ stanicama u omjeru 1:5. Kako bismo utvrdili razliku u stvaranju IFN-γ i IL-4 između nestimuliranih i MUC1 stimuliranih CD56⁺ stanica nakon kulture s nestimuliranim i MUC1 stimuliranim CD14⁺ stanicama koristili smo se metodom imunoflorescencije pri čemu smo unutar stanice obilježavali citokine, a nakon reintegracije stanične membrane, CD56 molekulom. Rezultati su izraženi kao razlika u postotku IL-4⁺ ili IFN-γ⁺ CD56⁺ stanica NK u odnosu na izotipsku kontrolu u svakoj pojedinoj grupi stanica.

Iz Slike 29A vidi se da CD56⁺ stanice luče podjednako IL-4 kada su kultivirane u mediju, u prisustvu MUC1, u prisustvu CD14⁺ stanica i u prisustvu CD14⁺ stanica pretretiranih s MUC1 te nije nađena statistički značajna razlika između ovih skupina kultiviranih stanica. Iz Slike 29B vidi se da CD56⁺ stanice luče podjednako IFN-γ kada su kultivirane u mediju, u prisustvu MUC1, u prisustvu CD14⁺ stanica i u prisustvu CD14⁺ stanica pretretiranih s MUC1 te nije nađena statistički značajna razlika između ovih skupina kultiviranih stanica.

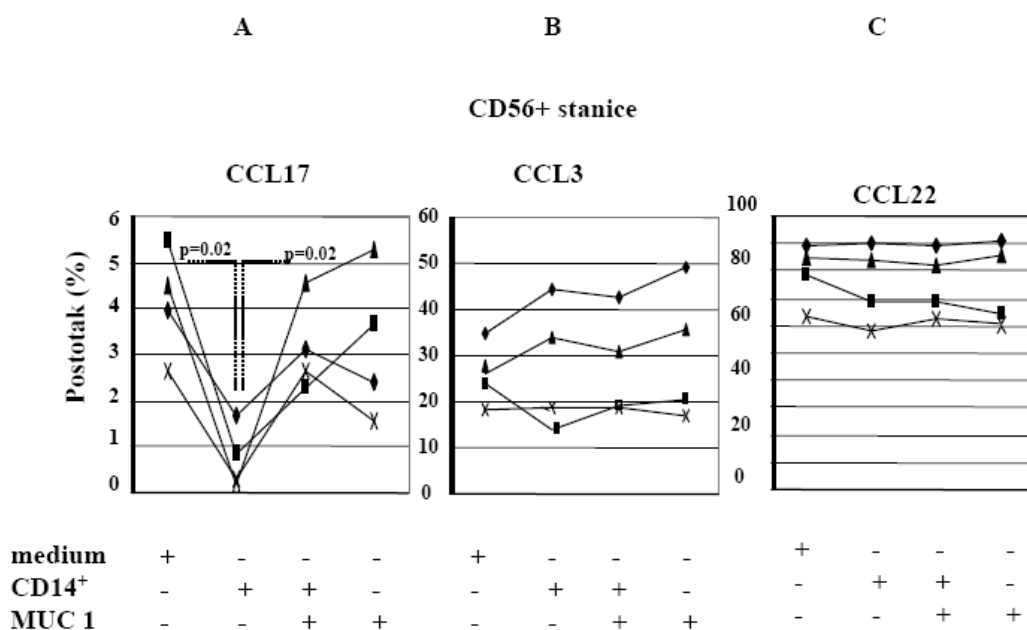


Slika 29. Grafovi prikazuju lučenje citokina IL-4 (A) i IFN- γ (B) u decidualnim CD56⁺ stanicama kultiviranim kroz 18 sati u mediju, u prisustvu CD14⁺ stanica u omjeru 5:1, u prisustvu CD14⁺ stanica stimuliranih kroz 5 sati s MUC1 u omjeru 5:1 (200 μ g/ml), ili u prisustvu MUC1 (200 μ g/ml)

4.8.2. Utjecaj nestimuliranih i MUC1 stimuliranih decidualnih CD14⁺ stanica na stvaranje kemokina u decidualnim CD56⁺ stanicama prvog tromjesečja trudnoće „in vitro“

Iz Slike 30 vidi se da 3-5% decidualnih CD56⁺ stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju za kulturu stanica stvara kemokin CCL17. Udio CCL17⁺ CD56⁺ stanica statistički se značajno smanjuje nakon ko-kulture s nestimuliranim CD14⁺ stanicama u omjeru 5:1 ($p=0,02$), međutim CD14⁺ stanice prethodno stimulirane s MUC1 bile su u mogućnosti održati stvaranje CCL17 u CD56⁺ stanicama NK temeljeno na učinjena 4 pokusa (slika 30A). Stimulacija s MUC1 nije sama mogla mijenjati izražaj CCL17 u odnosu na CD56⁺ stanice kultivirane samo u mediju za kulturu stanica. Udio CD56⁺

stanica koje izražavaju CCL3 i CCL22 nakon 18 sati kultivacije samo u mediju za kulturu stanica iznosio je 20-40%, odnosno 60-90% i nije se bitnije mijenjao u odnosu na stimulaciju s MUC1 ili nakon kulture s nestimuliranim ili MUC1 stimuliranim makrofagima. Učinjena su četiri istovjetna pokusa iz različitih uzoraka tkiva (Slika 30B i Slika 30C).

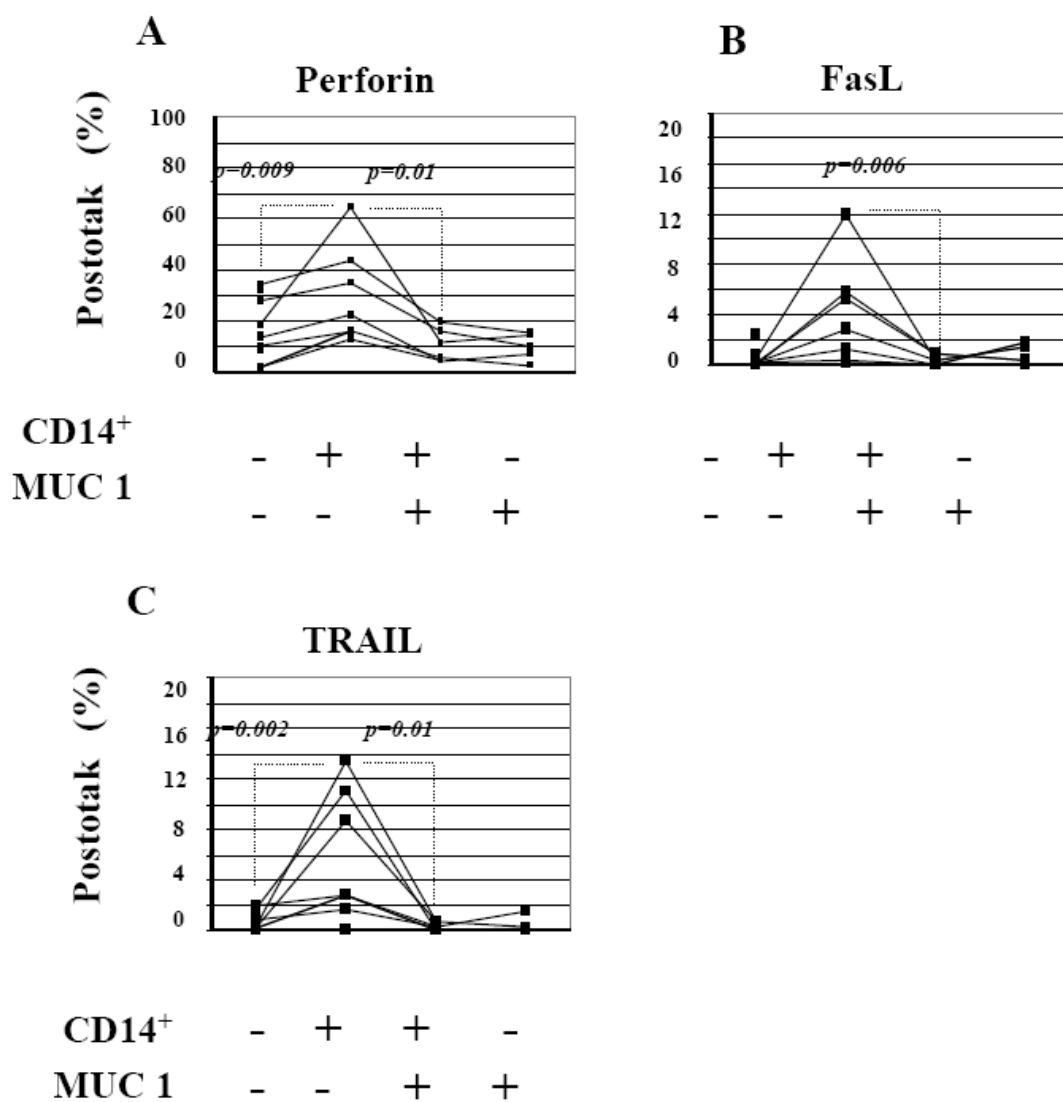


Slika 30. Grafovi prikazuju lučenje kemokina CCL17 (A), CCL3 (B) i CCL22 (C) u magnetskim izdvajanjem pročišćenim decidualnim CD56⁺ stanicama kultiviranim kroz 18 sati u mediju, u prisustvu CD14⁺ stanica u omjeru 5:1, u prisustvu CD14⁺ stanica pretretiranih kroz 5 sati s MUC1 u omjeru 5:1 (200 µg/ml), ili u prisustvu MUC1 (200 µg/ml).

4.8.3. Izražaj citotoksičnih medijatora u decidualnim CD56⁺ stanicama nakon kultivacije s CD14⁺ stanicama prethodno stimuliranim s MUC1

Magnetskim izdvajanjem obogaćenu populaciju decidualnih CD14⁺ stanica stimulirali smo tijekom 5 sati s MUC1 (200µg/ml) ili kultivirali samo u mediju za kulturu stanica, a zatim kultivirali daljnjih 18 sati s pročišćenim decidualnim autolognim CD56⁺ stanicama u omjeru 1:5. Kao kontrolne uzorke koristili smo CD56⁺ stanice kultivirane u istom vremenskom razdoblju samo u mediju ili u mediju s MUC1 (200 mg/ml). Po isteku kultivacije odredili smo izraženost unutarstaničnih citotoksičnih molekula: perforin, FasL i TRAIL u CD56⁺ stanicama metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom.

Rezultati su izraženi kao razlika u postotku CD56⁺ stanica dobivenih obilježavanjem protutijelima usmjerenim ka svakom pojedinom citolitičkom medijatoru i obilježavanjem protutijelom istog podrazreda, ali irelevantne specifičnosti (Slika 31). Do 40% pročišćenih CD56⁺ stanica kultiviranih samo u mediju izražava perforin (Slika 31A), a udio FasL (Slika 31B) i TRAIL (Slika 31C) apoptotičke molekule bio je znatno manji i iznosio je do 4%. Međutim u CD56⁺ stanicama kultiviranim s autolognim decidualnim CD14⁺ stanicama udio perforina i apoptotičke molekule FasL statistički se značajno povećao ($p=0,009$ odnosno $p=0,002$). CD14⁺ decidualne stanice prethodno stimulirane s MUC1 nisu bile u stanju održati razinu perforin, FasL i TRAIL citotoksičnih molekula u autolognim CD56⁺ stanicama NK te se udio perforin⁺ (Slika 31A), FasL⁺ (Slika 24B) i TRAIL⁺ (Slika 31C) decidualnih CD56⁺ stanica u suspenziji statistički značajno smanjio ($p=0,01$, $p=0,01$ odnosno $p=0,006$) u odnosu na CD56⁺ stanice kultivirane s nestimuliranim CD14⁺ stanicama. Prisustvo MUC1 u mediju za kulturu stanica nije bitnije mijenjao udio stanica s citolitičkim medijatorima u odnosu na stanice kultivirane samo u mediju, ali je smanjivao postotak CD56⁺ stanica koje izražavaju perforin, FasL i TRAIL u odnosu na stanice kultivirane s MUC1 stimuliranim CD14⁺ makrofagima.



Slika 31. Grafovi prikazuju izraženost citolitičkih medijatora perforina (A), FasL (B) i TRAIL-a (C) u CD56⁺ stanicama kultiviranim kroz 18 sati u mediju, u prisustvu CD14⁺ stanica u omjeru 5:1, u prisustvu CD14⁺ stanica pretretiranih kroz 5 sati s MUC1 u omjeru 5:1 (200 µg/ml), ili u prisustvu MUC1 (200 µg/ml).

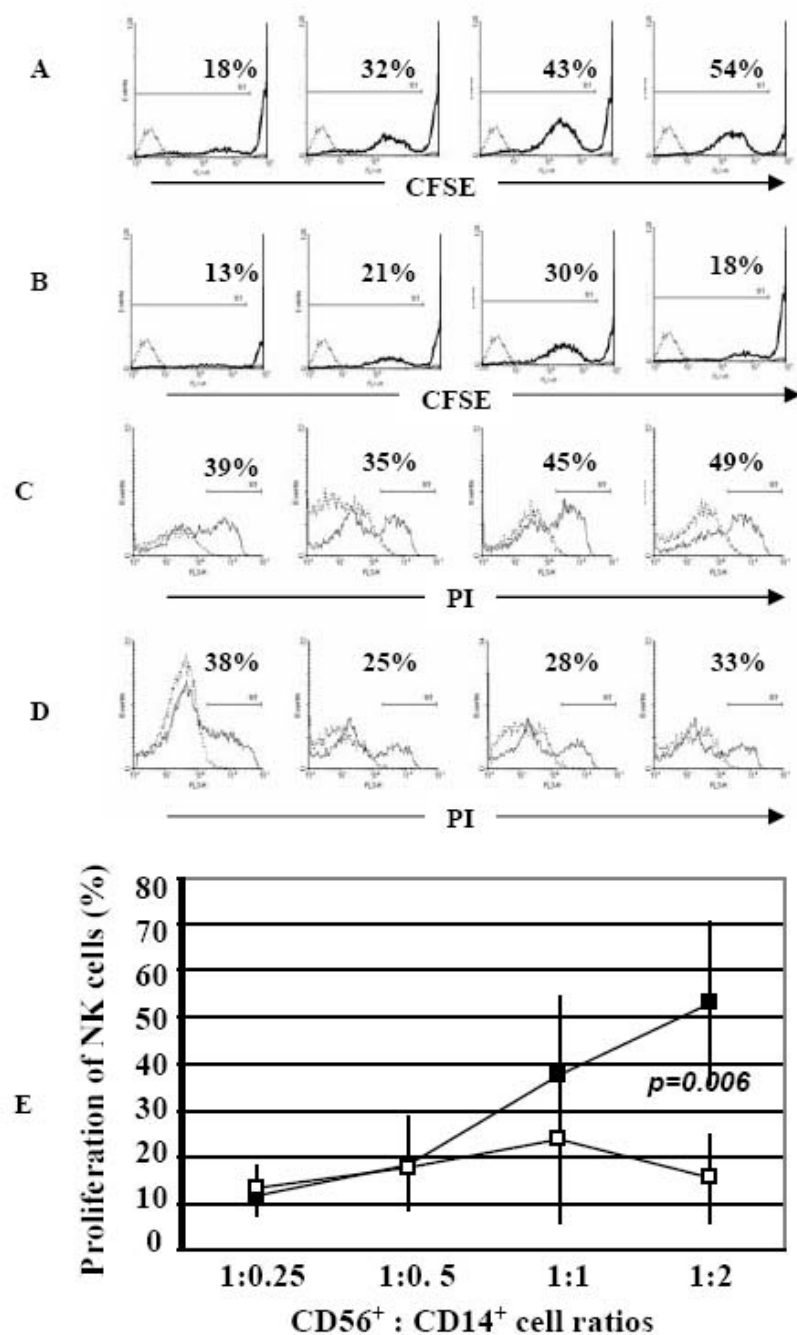
4.8.4. Proliferacija decidualnih CD56⁺ stanica nakon kultivacije s autolognim CD14⁺ stanicama

Decidualne CD56⁺ stanice dobivene magnetskim izdvajanjem obilježili smo s CFSE fluorescentnom bojom koja se nepovratno veže za stanične bjelančevine i smanjuje jačinu fluorescencije za 50% svakom diobom stanice te postavili u neposredni dodir tijekom 48-sati s decidualnim nestimuliranim CD14⁺ stanicama ili MUC1 (200 µg/ml) prethodno stimuliranim CD14⁺ stanicama tijekom 5 sati u omjeru 1:0.25, 1:0.5, 1:1 i 1:2. Potom smo stanice obilježili s protu-CD56 protutijelom te s PI koji se umeće u DNA mrtvih stanica, jer su žive stanice sposobne aktivnim transportom izbaciti PI iz stanice. Rezultate smo analizirali protočnim citometrom tako da smo elektroničku ogradu, označenu kao R1 postavili na CD56⁺ stanice, a potom smo elektroničku ogradu R2 postavili na CD56⁺ stanice koje su nakon bojenja s PI ostale neobojene, dakle žive stanice. Viabilne CD56⁺ stanice koje nisu obilježene s CFSE na početku testa (isprekidana krivulja histograma) predstavljaju negativnu kontrolu, dok CD56⁺ stanice obojene s CFSE na početku testa (tanka puna krivulja histograma) predstavljaju pozitivnu kontrolu obilježavanja (Slika 32A i 32B). Debela krivulja histograma preklopljena preko pozitivne i negativne kontrole pokazuje proliferaciju stanica NK nakon 48 sati kulture s nestimuliranim ili MUC1 stimuliranim CD14⁺ stanicama u navedenim omjerima (Slika 32A, odnosno Slika 32B). Postotak mrtvih, PI⁺CD56⁺ stanica u kulturi s nestimuliranim (Slika 32C) ili MUC1 stimuliranim stanicama (Slika 32D) prikazani su kao puni histogrami u odnosu na izotipsku kontrolu (iscrtkana krivulja histograma). Postotak mrtvih CD56⁺ stanica nakon kultivacije od 48 sati u prisustvu CD14⁺ stanica, iznosio je od 39% do 49% (Slika 32C), a bio je samo neznatno manji u CD56⁺ stanica kultiviranih s MUC1 stimuliranim CD14⁺ stanicama (Slika 32D). Pročišćene decidualne CD56⁺ stanice koje pripadaju elektroničkim ogradama R1 i R2 umnažaju se nakon kulture s nestimuliranim CD14⁺ stanicama od 18% do 54% (Slika 32A) te od 13-18% nakon kulture sa CD14⁺ stanicama prethodno stimuliranih s MUC1 (Slika 32B) u ovisnosti o

omjeru CD56⁺:CD14⁺ stanica 1:0,25, 1:0,5, 1:1 i 1:2 u prikazanom primjeru. Veći udio CD14⁺ stanica uzrokovao je veću proliferaciju stanica NK u još dodatno izvedena 3 neovisna pokusa, a dobivene srednje vrijednosti prikazuje Slika 32E. Ako smo decidualne CD14⁺ makrofage prethodno stimulirali s MUC1 proliferacija CD56⁺ stanica se statistički značajno smanjila u omjeru CD56⁺:CD14⁺ stanica 1:2 pri čemu je razina statističke značajnosti iznosila $p=0.006$ (Slika 32A).

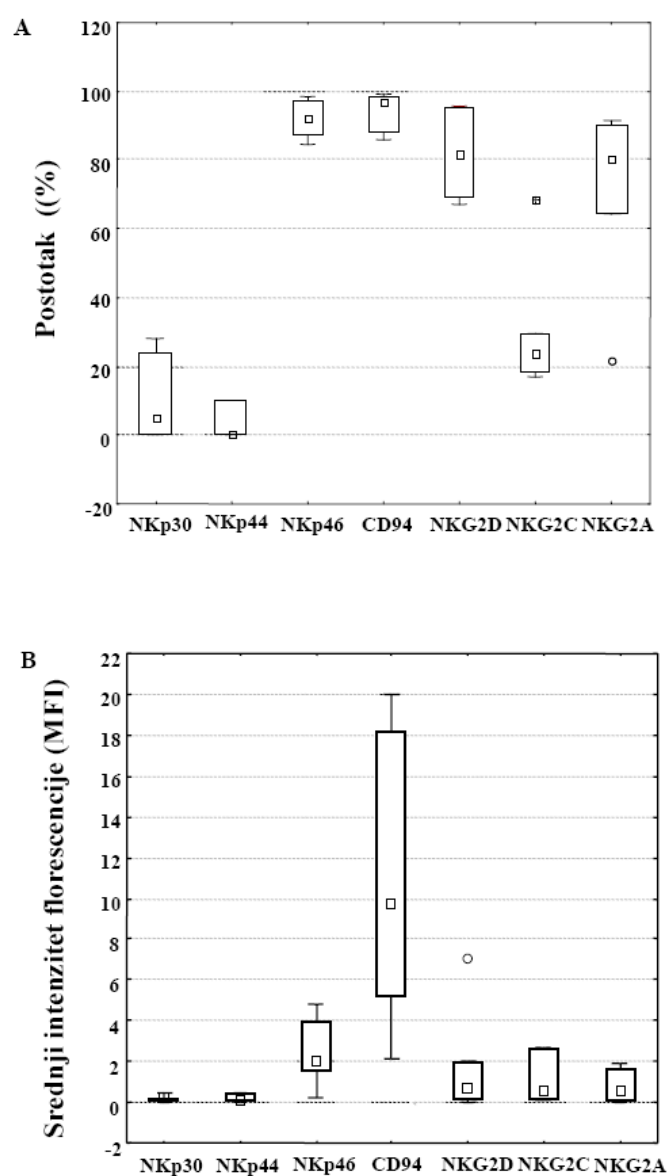
4.8.5. Izražaj aktivacijskih i inhibicijskih receptora na decidualnim stanicama NK

Stanice NK izražavaju široki raspon inhibicijskih i aktivacijskih receptora čija stimulacija određuje citotoksični odgovor stanice. Kako bi utvrdili koji su od ovih receptora prisutni na decidualnim stanicama NK, svježe izdvojene DMS obilježavali smo metodom imunoflorescencije pri čemu smo koristili monoklonska protutijela usmjerena ka CD3, CD56 biljezima i pojedinim NK receptorima (NKp30, NKp44, NKp46, CD94, NKG2D, NKG2C, NKG2A). Dobivene rezultate smo analizirali protočnom citometrijom. 90-100% decidualnih CD56⁺ stanica iz svježe suspenzije DMS izražava NKp46 i CD94 receptore s aktivacijskim, odnosno aktivacijsko/inhibicijskim svojstvima, a 70-90% izražava aktivacijski NKG2D homodimer i inhibicijski NKG2A receptor (Slika 33A). NKG2C izražava 20-30% stanica NK, dok njih 20% izražava NKp30 i NKp44 receptore (Slika 33A). MFI za svaki pojedini biljeg je bio nizak, a najveći je bio za CD94 i iznosio je do 20 (Slika 33B).



Slika 32. Histogrami prikazuju ogledne primjere analize proliferacije stanica NK nakon kultivacije s decidualnim CD14⁺ stanicama nestimuliranim (A) i stimuliranim s MUC1 (200 µg/ml) (B). Postotak mrtvih, PI⁺CD56⁺ stanica u kulturi s nestimuliranim (C) ili MUC1 stimuliranim stanicama (D) prikazani su kao puni histogrami u odnosu na izotipsku kontrolu (iscrtkana krivulja histograma).

Prikazani su rezultati dobiveni na osnovu 4 odvojena testa proliferacije decidualnih stanica NK dobivenih iz kulture s nestimuliranim (■) ili MUC1 stimuliranim (MUC 1) (□) decidualnim CD14+ stanicama u navedenim omjerima CD56+:CD14+ stanica (E).



Slika 33. Graf prikazuje izraženost NK receptora, NKp30, NKp44, NKp46, CD94, NKG2D, NKG2C, NKG2A (A) te MFI za svaki od pojedinih NK receptora (B) na površini decidualnih CD56+ stanica.

4.8.6. Citotoksičnost decidualnih stanica NK prema autolognim CD14⁺ stanicama

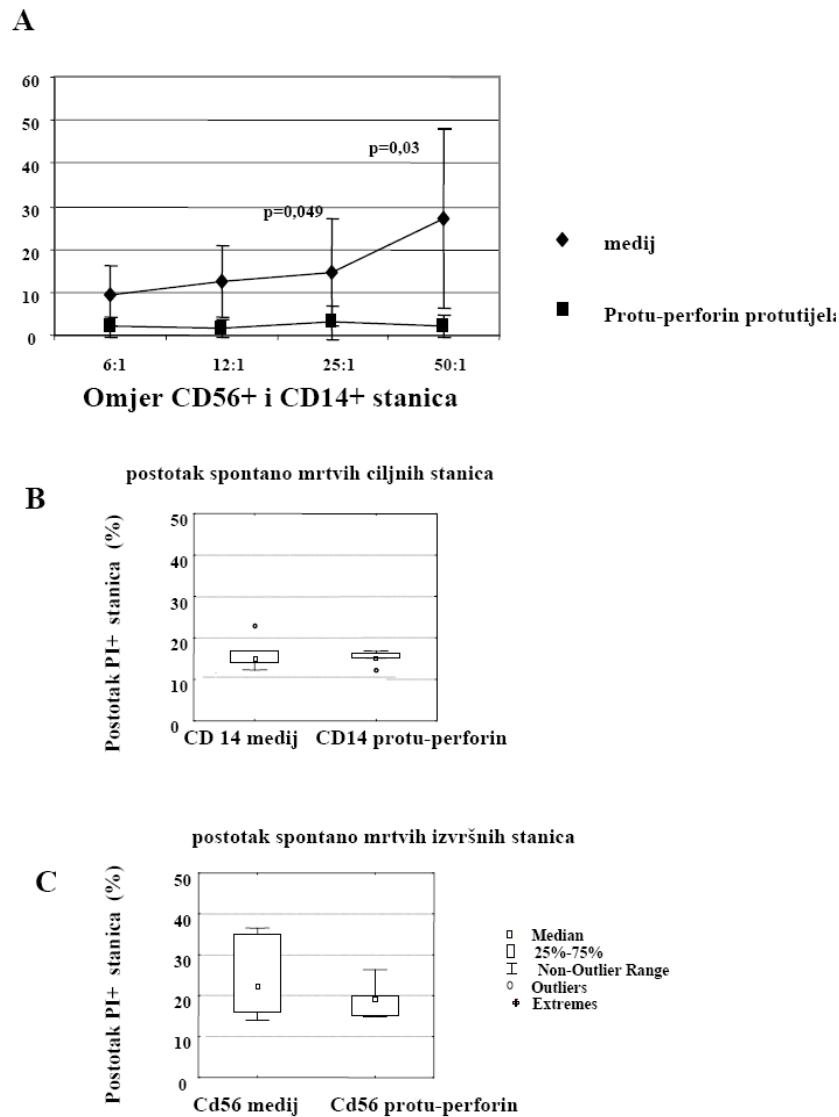
Kako bismo utvrdili sposobnost citotoksičnosti decidualnih stanica NK prema autolognim CD14⁺ stanicama u dvosatnom testu citotoksičnosti te način aktivacije i mehanizam ubijanja, decidualne adherentne stanice obilježili smo s PKH-26 crvenom bojom koja se nepovratno veže za bjelancevine stanice, a potom obogatili magnetskim izdvajanjem. Obilježene i u postotku obogaćene CD14⁺ stanice postavili smo u neposredan dodir s pročišćenim autolognim CD56⁺ stanicama u omjerima 6:1, 12.5:1, 25:1 i 50:1.

Postotak mrtvih PI⁺CD14⁺ stanica u testu citotoksičnosti raste kako se povećava omjer CD56⁺ i CD14⁺ stanica (Slika 34A). Tako postotak mrtvih CD14⁺ stanica prosječno iznosi pri omjeru CD56⁺ i CD14⁺ stanica 6:1 9,29%, pri omjeru 12.5:1 iznosi 12,3%, pri omjeru 25:1 iznosi 14,68%, a pri omjeru 50:1 iznosi 27,21%. Dodatkom blokirajućih protutijela usmjerenih prema perforinu u test citotoksičnosti smanjuje se citotoksičnost u svim omjerima, ali se statistička značajnost postiže u omjerima 25:1 i 50:1 na razini značajnosti $p=0,049$ odnosno $p=0,03$ (Slika 34A). Postotak spontano mrtvih ciljnih stanica iznosi oko 15% (Slika 34B), a izvršnih stanica od 15-35% (Slika 34C) i ne razlikuje se bitno od postotaka spontano mrtvih stanica u testu s protu-perforinskim protutijelom.

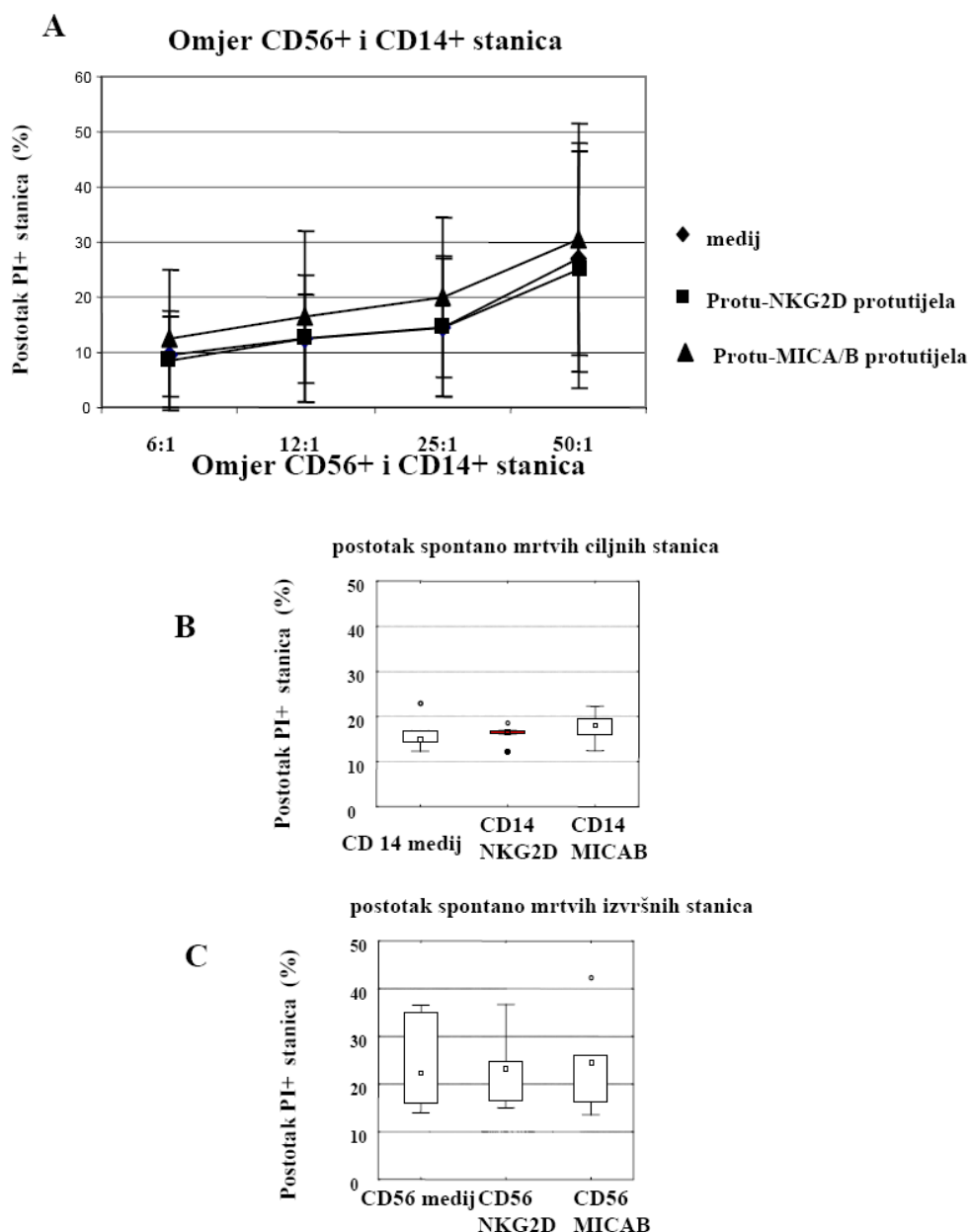
4.8.7. Utjecaj aktivacijskog receptora NKG2D i njegovih liganada MIC A/B na citotoksičnost decidualnih CD56⁺ stanica prema decidulnim CD14⁺ stanicama

Aktivacijski receptor NKG2D i njegovi ligandi MICA/B ne sudjeluju u ubijanju CD14⁺ stanica posredstvom decidualnih autolognih CD56⁺ stanica, jer nije nađena statistički značajna razlika u ubijanju CD14⁺ stanica pri pojedinim omjerima u testovima izvođenim samo u mediju u odnosu na testove izvođene uz dodatak blokirajućih

protutijela protiv NKG2D ili MICA/B (Slika 35A). Postotak spontano mrtvih ciljnih stanica (Slika 35B) i izvršnih stanica (Slika 35C) ne razlikuje se bitno između testiranih skupina.



Slika 34. Graf A prikazuje citotoksičnost decidualnih CD56⁺ stanica prema autolognim CD14⁺ stanicama u 2-satnom testu citotoksičnosti izvedenom samo u mediju (♦) ili uz prisutnost 20 µg/ml protu-perforin monoklonskih protutijela (■). Graf B prikazuje postotak spontano mrtvih ciljnih stanica, a graf C postotak spontano mrtvih izvršnih stanica kultiviranih u mediju ili u prisustvu odgovarajućih blokirajućih protutijela.



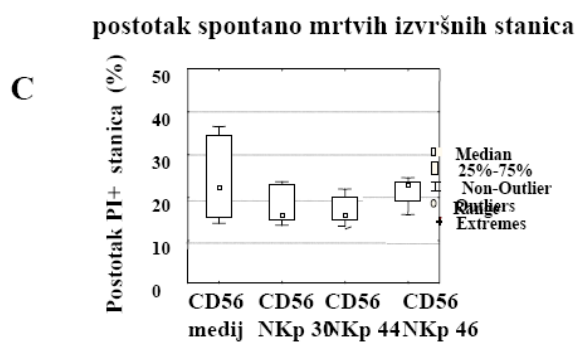
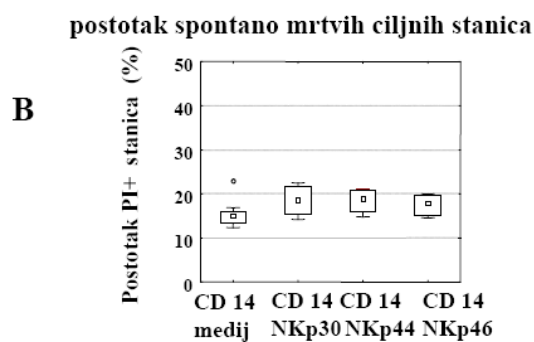
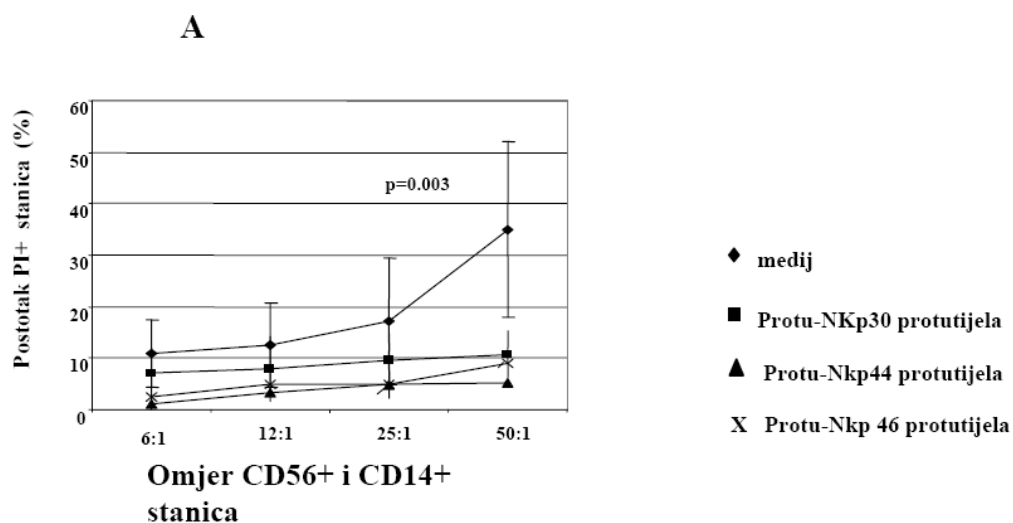
Slika 35. Graf A prikazuje utjecaj blokirajućih 20 µg/ml protutijela protiv aktivacijskog receptora NKG2D (■) i njegovih liganada MIC A/B (▲) na ubijanje CD14⁺ stanica posredovanog CD56⁺ stanicama u usporedbi s citotoksičnošću ostvarenom u kulturi samo u mediju (♦). Graf B pokazuje postotak spontano mrtvih ciljnih stanica, a graf C postotak spontano mrtvih izvršnih stanica kultiviranih u mediju za kulturu stanica ili u prisustvu odgovarajućih blokirajućih protutijela.

4.8.8. Utjecaj NRC, NKp30, NKp44 i NKp46 na citotoksičnost decidualnih CD56⁺ stanica prema decidualnim CD14⁺ stanicama

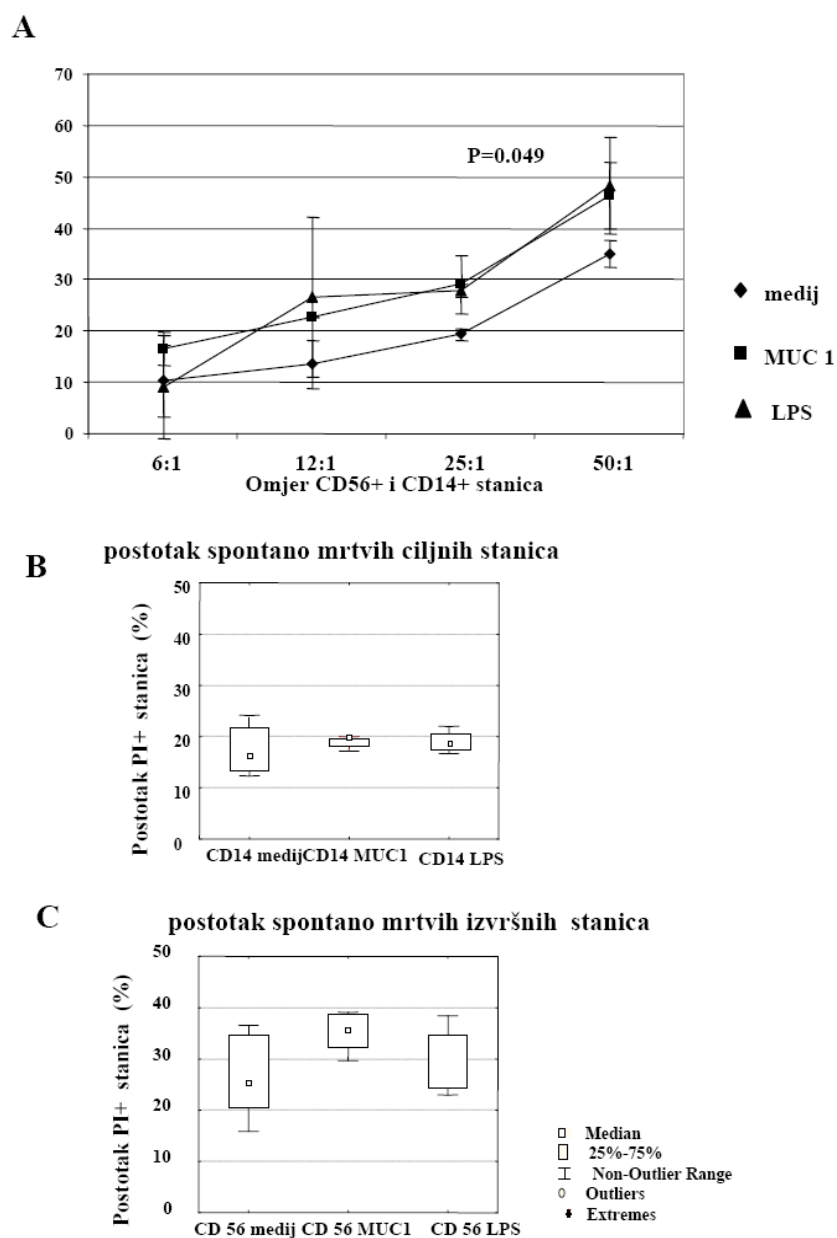
Kako bismo istražili ulogu NK staničnih receptora, NKp30, NKp44 i NKp46 u ubijanju CD14⁺ 2-satni test citotoksičnosti smo izvodili samo u mediju ili u prisutnosti protutijela usmjerenih prema navedenim NK receptorima. Općenito govoreći, postotak PI⁺CD14⁺ stanica u izvedenih 5 pokusa je niži u uzorcima testa citotoksičnosti koji su izvođeni uz prisustvo protutijela usmjerenih prema NKp30, NKp44 ili NKp46 (Slika 36A). Pri omjeru CD56⁺: CD14⁺ stanica 50:1 postotak mrtvih CD14⁺ stanica iznosi oko 35%, a uz dodatak anti-NKp30 protutijela iznosi 10,74%, odnosno 5,21% ili 9,06% uz dodatak protu-NKp44 ili protu-NKp46 protutijela. To predstavlja statistički značajno smanjenje citotoksičnosti na razini $p=0.003$ (Slika 36A). Udio spontano mrtvih ciljnih (Slika 36B) i izvršnih stanica (Slika 36C) nije se statistički značajno razlikovao između ispitivanih grupa.

4.8.9. Citotoksičnost CD56⁺ stanica prema decidualnim CD14⁺ stanicama stimuliranih Lipopolisaharidom ili MUC1

Decidualne CD56⁺ stanice ubijaju autologne CD14⁺ stanice stimulirane s lipopolisaharidom (100 ng/ml) ili MUC1 (200 µg/ml) većom prosječnom učinkovitošću i to od 10-50% u omjerima od 6:1 do 50:1 u odnosu na nestimulirane CD14⁺ stanice kultivirane samo u mediju (Slika 37A). Ta razlika je statistički značajna na razini $p=0,049$ u omjerima CD56⁺:CD14⁺ 25:1 i 50:1 na temelju podataka dobivenih u 4-5 ponavljanih neovisnih pokusa (Slika 37A). Udio spontano mrtvih ciljnih CD14⁺ stanica iznosio je od 15-25% (Slika 37B), a broj izvršnih CD56⁺ stanica od 20-40% (Slika 37C), ali nije se statistički značajno mijenjao između ispitivanih skupina.



Slika 36. Graf A prikazuje utjecaj 20 $\mu\text{g/ml}$ protutijela protiv NKp30 (■), NKp44 (▲) i NKp46 (×) na ubijanje CD14⁺ stanica posredovano CD56⁺ stanicama u usporedbi s citotoksičnošću ostvarenom u kulturi samo u mediju (◆). Graf B prikazuje postotak spontano mrtvih ciljnih stanica, a graf C postotak spontano mrtvih izvršnih stanica kultiviranih u mediju ili u prisustvu blokirajućih protutijela.



Slika 37. Graf A prikazuje citotoksičnost CD56+ stanica prema autolognim nestimuliranim CD14+ stanicama (♦), CD14+ stanicama stimuliranim tijekom prethodnih 18 sati s 200 µg/ml MUC1 (■) ili 100 ng/ml lipopolisaharida (▲). Graf B prikazuje postotak spontano mrtvih ciljnih stanica i graf C postotak spontano mrtvih izvršnih stanica kultiviranih u mediju ili u prisustvu odgovarajućih blokirajućih protutijela.

5. RASPRAVA

Decidualne CD14⁺ stanice su nakon decidualnih CD56⁺ stanica najbrojnija leukocitna stanična populacija (135). Međutim, unatoč njihovoj prevalenciji kao i njihovom smještaju u blizini trofoblasta, decidualnih žlijezda i krvnih žila nedovoljno pozornosti je posvećeno makrofagima u dosadašnjim istraživanjima. Naše određivanje fenotipskih obilježja CD14⁺ stanica ukazuje na to da su decidualne CD14⁺ stanice specifična populacija leukocita koja se bitno razlikuje od odgovarajućih stanica periferne krvi trudnih žena kao i decidualnih dendritičkih stanica. Naime, Kammerer i sur. (302) pokazali su da decidua, osim malobrojne populacije nezrelih CD1a⁺ stanica, intermedijarnih CD205⁺ dendritičkih stanica (76) i zrelih dendritičkih CD83⁺ stanica CD40⁺, CD45⁺, HLA-DR⁺⁺ fenotipa sadrži i tkivno specifične CD14⁺ makrofage (302). Decidualni makrofagi na svojoj površini izražavaju CD4/HLA-DR/CD68 (302), a mogu izražavati i CD209 receptor za endocitozu koji je izražen na dendritičkim stanicama i veže se za ICAM-3 te tako posreduje u aktivaciji naivnih limfocita T, a sudjeluje i u kruženju dendritičkih stanica (303). Mononuklearne stanice periferne krvi i makrofagi koji potječu od monocita ne izražavaju CD209 u perifernoj krvi i različitim tkivima (303), ali pod utjecajem okoliša, mogu ga izražavati kao što su Soilloux i sur. (303) pokazao za decidualne makrofage.

Kako bismo razlučili makrofage od decidualnih dendritičkih stanica, CD14⁺ stanice obilježavali smo s protutijelima usmjerenim prema CD1a i CD83 biljezima, svojstvenim za dendritičke stanice. Molekula CD1a je biljeg dendritičkih stanica (304) može se pojaviti kratkotrajno na monocitima periferne krvi aktiviranim superantigenom i posredovati aktivaciju limfocita T npr. stimuliranih stafilokoknim enterotoksinom A ili toksinom-1 (305). Molekula CD83 pripada obitelji imunoglobinskih receptora i obilježje je zrelih dendritičkih stanica (306), iako njezin izražaj može biti potaknut IFN- α u citoplazmi monocita, makrofaga i limfocita B, koji se po stimulaciji LPS-om kratkotrajno i prolazno mogu pojaviti i na površini stanice

(307). Metodom imunofluorescencije na početku našeg istraživanja utvrdili smo da svježe izdvojene decidualne CD14⁺ stanice izražavaju zaista zanemarivi postotak (<1%) CD1a i CD83 antigena. Ovo je sukladno činjenici da se CD14⁺ stanice ne mogu diferencirati u dendritičke stanice u prisustvu GM-CSF i IL-4 (138), prisutnog u decidualnom tkivu rane trudnoće (138). Time smo potvrdili da CD14⁺ stanice u decidui predstavljaju makrofage u skladu s rezultatima Gustafsson i suradnika (308). No, kako bismo u potpunosti uklonili mogućnost zagađenja izdvojenih i pročišćenih decidualnih CD14⁺ makrofaga decidualnim dendritičkim stanicama u našim pokusima ko-kulture in vitro, pročišćavali smo CD14⁺ stanice iz suspenzije adherentnih stanica iz koje su magnetskim izdvajanjem prethodno uklonjene CD1a⁺ dendritičke stanice.

Poput decidualnih CD14⁺ stanica, i CD14⁺ stanice periferne krvi (monociti) u našim su pokusima neznatno izražavali CD1a i CD83 antigene na svojoj površini. Na taj smo način utvrdili da decidualne CD14⁺ stanice i CD14⁺ stanice periferne krvi ne izražavaju biljege dendritičkih stanica.

Makrofagi, kao i ostale upalne stanice na mjesto upale stižu vođene različitim kemokinima. Naši rezultati pokazuju da decidualne CD14⁺ stanice statistički značajno više izražavaju pro-upalnog CCR5 na svojoj površini u usporedbi sa CD14⁺ stanicama periferne krvi što upućuje na to da su ove stanice sposobne putovati prema pro-upalnim čimbenicima koji su prisutni u decidui tijekom rane trudnoće kao što su CCL3 (144) i CCL2 (309). Kemokin CCL2 pripada u skupinu β -kemokina i djeluje kao kemoatraktant za monocite, eozinofile i bazofile (309). Metodom imunohistokemije dokazana je njegova prisutnost na mjestu eutopične i ektopične implantacije i raspoređen je pretežno na stromalnim i epitelnim stanicama, što je zapravo u neposrednoj blizini decidualnih makrofaga (310). Kemokin CCL2 vjerojatno posreduje u regrutiranju makrofaga u deciduu (276), a s druge strane

privlači blastocistu tijekom peri-implantacijskog razdoblja budući da ona izražava receptor za CCL2 ili CCR2. Porast CCL2 podupire povišena koncentracija pro-upalnih citokina u endometriju, uključujući TNF- α i IL-1 β koji mogu dovesti do porasta razine CCL2 (276), a povišena razina pro-upalnih kemokina, kao što je CCL2 mogao bi dovesti do prejake mobilizacije makrofaga što može dovesti do nedostatnog prepoznavanja i prodiranja trofoblasta u deciduu i spiralne arterije tijekom preeklampsije (276). Drugi kemokin koji igra značajnu ulogu u novačenju makrofaga je CCL3, jer makrofagi izražavaju receptor za CCL3 - CCR5 (311). CCL3 ujedno privlači memorijske/izvršne limfocite Th1 orijentacije, nezrele dendritičke stanice i stanice NK na način ovisan o koncentraciji (312) i stvara preduvjet za međudjelovanje glavnih izvršnih subpopulacija leukocita u pro-upalnom okružju (312), koje su od posebne važnosti za vrijeme implantacije. Iako CCL2 uzrokuje privlačenje monocita na mjesto upale, istraživanja su pokazala da CD14⁺CD16⁺ monociti ne migriraju u odgovoru na CCL2 već migriraju u odgovoru na CXCL1 i CXCL12 (314). U suvremenoj znanstvenoj literaturi ne postoje podatci koji upućuju na razlike u izražavanju CCR5 na subpopulacijama makrofaga.

Kako bismo pobliže fenotipski odredili decidualne CD14⁺ stanice i razlikovali ih od CD14⁺ stanica periferne krvi trudnih žena koristili smo se protutijelima usmjerenim prema CD16, CD163, CD206 i CD209 biljega. Prema ranijim istraživanjima monociti periferne krvi dijele se u dvije osnovne subpopulacije na temelju izraženosti površinskih biljega CD14 i CD16 (82). Tzv. klasična subpopulacija koja čini 90-95% cirkulirajućih monocita izražava visoku razinu CD14 i nisku razinu CD16 (CD14^{high}CD16^{low}) te luči protu-upalne citokine, uključujući IL-10 (82). Malobrojnija pro-upalna subpopulacija makrofaga izražava niske razine CD14, a visoke razine CD16 (CD14^{low}CD16^{high}) (313) te izražava visoku razinu HLA-DR, ILT-4, CD43 i CD45RA (314). Broj stanica koje pripadaju pro-upalnoj subpopulaciji raste tijekom akutne faze bolesti, kao što je to slučaj kod Kawasakijske bolesti (315), sepse (316) te

kroničnih upalnih bolesti kao što su reumatoidni artritis (317) i HIV infekcija (318), što znači da povećavaju pro-upalnu reakciju (313). Budući da ove stanice izražavaju više HLA-DR na svojoj površini u usporedbi s klasičnim monocitima, ove bi stanice potencijalno mogle biti učinkovitije u predočavanju antigena kao i dendritičke stanice koje nastaju iz ovih monocitnih prekursora u odgovoru na prisustvo TLR2 liganada (314).

Naši rezultati pokazuju da decidualne CD14⁺ stanice neznatno izražavaju CD16 molekulu na svojoj površini što govori u prilog njihovoj protu-upalnoj orijentaciji, smanjenoj sposobnosti fagocitoze opsoniziranih čestica i imunih kompleksa te smanjene sposobnosti stvaranja TNF- α u odgovoru na LPS, dok 13, 47% CD14⁺ stanica periferne krvi izražava ovaj biljeg što odgovara njihovom normalnom broju u perifernoj krvi zdravih žena koje nisu trudne (319).

Gotovo 50% decidualnih CD14⁺ stanice izražava CD163 dok samo 3% CD14⁺ stanica periferne krvi izražava ovaj površinski antigen. S obzirom da se ovaj receptor povezuje s alternativno aktiviranim makrofagima, njegovo prisustvo na površini decidualnih CD14⁺ stanica ide u prilog već postojećim, iako malobrojnim, dokazima o decidualnim CD14⁺ stanicama kao M2 makrofagima. Biljeg CD163 je izražen na površini stanica koje pripadaju monocitno-makrofagnom sustavu, te pripada u skupinu tzv. SRC (od engl. Scavenger receptor cystein rich) receptora ili receptora „čistača“. Služi za uklanjanje vlastitih i stranih makromolekula poput LDL (od engl. Low density lipopolisacharide), hemoglobina (320, 321), različitih patogenih mikroorganizama kao što su bakterije i virusi te sprječava njima posredovana oštećenja u krvi i tkivima. Međudjelovanje jednog od ovih liganada s CD163 dovodi do receptorom posredovane endocitoze, ali može i dovesti do aktivacije unutarstaničnog prenošenja signala što upućuje na to da CD163 djeluje kao imunomodulator (322). Proteinski dio haptoglobin-hemoglobinskog kompleksa

nastaje hemolizom crvenih krvnih stanica u upali, razgrađuje se u lizosomima, a razgradnja hema odvija se djelovanjem citoplazmatske hem-oksigenaze (321). Postoje dokazi da ovaj metabolički put regulira upalu na najmanje dva načina. Receptor CD163 izravno utječe na unutarstanično prenošenje signala što izravno dovodi do povećanja stvaranja i lučenja citokina kao što su TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 (323). Osim toga, što je i najvažnije, CD163 dovodi do ulaska hemoglobina u makrofage koji potiče protu-upalni odgovor jer metaboliti hema imaju potencijalno protu-upalno djelovanje (321). CD163 odcjepljen od membrane posredstvom metaloproteinaza pod djelovanjem LPS-a djeluje protu-upalno (324.) i sprječava umažanje limfocita T po stimulaciji s forbol-miristat acetatom (326). CD163⁺ makrofagi povećano luče IL-10 (327) te je visoka izraženost ovog receptora zamjećena na površini alternativno aktiviranih makrofaga koji igraju ključnu ulogu u stišavanju imunološkog odgovora i ukljanjanju dijelova oštećenih stanica (321). Protu-upalni čimbenici mehanizmom pozitivne povratne sprege dovode do povećanja izraženosti CD163 na površini monocita/makrofaga, dok pro-upalni čimbenici smanjuju njegovu izraženost (322). CD163 djeluje kao receptor za citotoksičku molekulu TWEAK koja je raspoređena na stanicama različitih tkiva (322), pa vezanje TWEAK za CD163 predstavlja način uklanjanja regrutiranih makrofaga iz tkiva na kraju upalnog procesa (322).

Manozni receptor je tip I transmembranskog proteina koji je svrstan u grupu I C tip lektinskih receptora odgovornih za endocitozu, ali i za stanično signaliranje (327). Izražen je na makrofagima, ali i na humanim nezrelim dendritičkim stanicama koje potječu od monocita (328) i na subpopulaciji mišjih dendritičkih stanica (328). Th2 citokini, IL-4, IL-13, i IL-10 dovode do povećane izraženosti manoznog receptora na površini stanica, dok IFN- γ dovodi do njegovog smanjenja. Smatra se da je manozni receptor uključen u fagocitozu različitih patogena (329), sposoban je prepoznati vlastite i strane antigene i sudjeluje u homeostazi i fiziološkom odstranjenju stanica (102). Približno 70% decidualnih makrofaga izražava manozni receptor za razliku od

izraženosti ovog receptora na CD14⁺ stanicama (monocitima) periferne krvi. To upućuje na to da bi ovaj receptor u decidui mogao značajnije ostvarivati svoju biološku ulogu. Pored internalizacije krupnijih čestica aktiviranjem klasičnih receptora za fagocitozu (142), vezanje šećernih komponenti za manozni receptor moglo bi doprinositi poticanju protu-upalnog programa u makrofagima (330). Stanice koje izražavaju manozni receptor na svojoj površini nalaze se u stromi, pretežno smještene oko žlijezda. Njihova raspodjela uvelike podsjeća na raspodjelu makrofaga s obzirom da velik postotak CD14⁺ stanica izražava manozni receptor. Makrofagi su za vrijeme prodiranja trofoblastnih stanica i pregradnje spiralnih arterija smješteni u njihovoj blizini tijekom normalne trudnoće (118). U normalnim okolnostima makrofagi olakšavaju prodiranje trofoblasta dok se u određenim patološkim stanjima kao što je preeklampsija, smještaju u lumen spiralnih arterija, čine prepreku prodiranju trofoblastnih stanica i onemogućavaju njegovu diferencijaciju poticanjem apoptoze i onemogućavanjem pregradnje spiralnih arterija (118).

Endocitozni receptor CD209 izražen je većinom na površini dendritičkih stanica. Soilloux i sur. (303) pokušali su dokazati prisustvo CD209 na površini različitih tkivnih makrofaga kao i monocita periferne krvi bez prisustva poticajnih čimbenika, ali ove stanice u normalnim okolnostima ne izražavaju CD209 biljeg. Međutim, dodatak IL-13 dovodi do značajnog povećanja izraženosti CD209 na površini makrofaga. Zanimljivo je da je IL-13 prisutan u posteljici, a Soilloux i sur. (303) su pokazali obilje stanica koje izražavaju CD209 u decidui te zaključili da mikrookoliš „in vivo“ nadzire izraženost CD209 na površini makrofaga. Osim toga, novija istraživanja pokazala su da se CD209 pojavljuje na površini monocita 24 sata nakon dodatka GM-CSF i IL-4 (331). Aktivacija CD209 endocitnog receptora koji sadrži domen za prepoznavanje ugljikohidrata vezanjem oligosaharida koji sadrže manozu ili fukozu dovodi do prenošenja signala u stanicu što dalje dovodi do promjena u

lučenju citokina i mijenjanju imunološkog odgovora usmjeravanjem Th1 ili Th2 obrasca stvaranja i lučenja citokina (303). Pokazano je da aktivacija CD209 na dendritičkim stanicama vezanjem patogena koji sadrže manozu dovodi do povećanog lučenja IL-10, IL-12 i IL-6, a vezanjem patogena koji sadrže fukozu do povećanog lučenja IL-10, dok je lučenje IL-6 i IL-12 smanjeno (331). Naša istraživanja pokazala su razliku u izraženosti ovog receptora na površini monocita periferne krvi trudnih žena i makrofaga u decidui. I dok 41% decidualnih makrofaga izražava CD209 vjerojatno pod utjecajem sredine svojstvene za tkivo, monociti periferne krvi ne izražavaju ovaj receptor. Uloga CD209 u decidui nije razjašnjena, ali mogao bi, kao i manozni receptor, imati ulogu u uklanjanju patogena bez pro-upalne aktivacije imunološkog sustava, a poticanjem lučenja Th2 citokina nadzirati imunološki odgovor. Smještaj decidualnih CD14⁺ stanica koje izražavaju manozni receptor ili CD209 receptore za endocitozu u blizini žlijezda upućuje na mogućnost da te stanice pomoću receptora za glikoproteine vežu tvari koje luče žljezdane stanice i na taj način izravno utječu na imunološki odgovor (58).

Makrofagi su stanična populacija koja potječe od monocita i specifični faktori prisutni u različitim tkivima potiču konačnu diferencijaciju monocita u tkivne makrofage kao izrazito heterogenu skupinu stanica (83). Klasično aktivirani ili tip 1 makrofaga (M1) koji nastaju u pro-uplanom citokinskom okolišu, u prisustvu IFN- γ , TNF- α , vezanjem PAMPs (od engl. Pathogen associated molecular pattern) kao što su LPS, lipoproteini, dsRNA, lipotehoidna kiselina i slično ili endogenih tzv. „opasnih“ signala kao što su bjelančevine toplinskog šoka, pokazuju pro-upalni profil, luče upalne citokine kao što su IL-12, IL-23, IFN- γ i snažni su promotori Th1 imunološkog odgovora (87). Prisustvo ovakvih makrofaga na spoju majčinih i fetalnih tkiva, s jakim pro-upalnim usmjerenjem dovelo bi do posljedica pogubnih za trudnoću. Alternativno aktivirani ili tip II makrofaga (M2), potaknuti Th-2 citokinima, izražavaju protu-upalna svojstva i omogućuju obnavljanje tkiva te su važni za ubijanje izvanstaničnih parazita (88).

vjerojatno su prisutni na mjestima gdje je potrebno osigurati zaštitu od pretjeranog upalnog odgovora. Makrofagi se ne nalaze u stanju trajne diferencijacije kao npr. Th1 ili Th2 limfociti, već pokazuju određenu plastičnost te mogu postati M1 ili M2 makrofagi ovisno o lokalnim uvjetima (92). Dakle, makrofagi se mogu re-polarizirati sekundarnim djelovanjem Th1 ili Th2 citokina ili utjecajem vanjskih „opasnih“ signala kao što su pokazali Gratchet i sur. Naime, M1 potaknuti primarno s IFN- γ odgovaraju na aktivaciju s IL-4 i IL10 „de-novo“ lučenjem Th2 kemokina, kao što su AMAC-1, (od engl. Alternative activated macrophage associated CC chemokine) i IL-1 receptor antagonist i povećanjem fagocitoze te smanjenjem baktericidnosti. M2 također odgovaraju na klasičnu aktivaciju s IFN- γ smanjenjem fagocitne aktivnosti i značajnim povećanjem sposobnosti ubijanja bakterija, ali nisu sposobni lučiti TNF- α , IL-1 β i IL-12 dok u odgovoru na LPS M1 i M2 luče IL-1 β i TNF- α , dok M2 luče i IL-12 (332). Sposobnost makrofaga da repolariziraju i odgovaraju na vanjske signale je preduvjet za mijenjanje postojećeg imunološkog odgovora tako da mogu primjereno odgovoriti na različite, vlastite i tuđe antigene (332).

Nakon što antigen predočne stanice prerade i predoče antigen limfocitima T u sklopu molekula MHC, moraju limfocitima T osigurati i kostimulacijski ili drugi signal kako bi došlo do njihove aktivacije (333). Kostimulacijske molekule CD80 (B7.1) i CD86 (B7.2) su biljezi koji su izraženi na površini makrofaga i dendritičkih stanica. Međudjelovanje ovih molekula s njihovim ligandima na površini limfocita T, CD28 dovodi do aktivacije limfocita T i početka specifičnog imunološkog odgovora. Kada je međudjelovanje između CD86 i CD28 onemogućeno dolazi do nastanka antigen-specifičnih imunoregulacijskih limfocita T koji su sposobni potisnuti aloreaktivne limfocite T, a olakšati preživljavanje presatka. Aktivacija CD80 i CD86 pomoću CTLA-4, koji je konstitucijski izražen na CD4⁺CD25⁺ regulacijskim limfocitima T (333), dovodi do povećane izraženosti IDO u decidualnim makrofagima što može jednim dijelom objasniti snošljivu aktivaciju regulacijskih limfocita T prisutnih u

decidui tijekom normalne trudnoće (333). Iz naših rezultata vidljivo je da decidualne CD14⁺ stanice izražavaju značajno manje kostimulacijskih molekula, CD80 i CD86, u odnosu na monocite periferne krvi trudnih žena što upućuje na njihovu tolerogenu ulogu i smanjenu sposobnost u predočavanja antigena, jer su manje učinkovite u prenošenju kostimulacijskog signala limfocitima T (138).

Makrofagi su sposobni vezati i internalizirati mucine pomoću svoje karbohidratne domene (60), zahvaljujući sposobnosti prepoznavanja manoze, fukoze i N-acetilglukozaminskih šećernih ostataka pomoću domene za prepoznavanje ugljikohidrata (141). Promjena izraženosti manoznog receptora na površini makrofaga izravno odražava njihovu sposobnost endocitoze te se može mjeriti pomoću unosa FITC-dextrana u stanice. Kao specifični ligand za domenu koja prepoznaje ugljikohidrate manoznog receptora, FITC dextran ulazi u stanicu posredstvom manoznog receptora (63). U našim pokusima poticali smo decidualne makrofage s rastućim koncentracijama lipopolisaharida te smo nakon toga određivali sposobnost endocitoze FITC-dextrana. Pokazali smo da i nakon stimulacije s lipopolisaharidom decidualne CD14⁺ stanice intenzivno unose FITC-dextran što upućuje na to da su decidualne CD14⁺ stanice izrazito M2 aktivirane i ne mogu biti repolarizirane s lipopolisaharidom „in vitro“. Naime, kod alternativno aktiviranih makrofaga, moguća je djelomična repolarizacija jer su potisnuti signalni putevi posredovani s NFkappaB, koji prenose M1 signal u stanicu, (156). Podjedinica NF-kappaB, p50, regulira M2 upalni odgovor tako da potiskuje aktivnost NF-kappaB koji inače dovodi do lučenja Th1 citokina, prije svega IFN γ , a miševi kojima nedostaje gen za P50 pokazuju izraženiju M1 posredovanu upalu i sklonost alergijama te smanjen odgovor na parazite koji je posredovan M2 odgovorom (334). Kako bismo potvrdili da su decidualni makrofagi M2 aktivirane te da ih LPS ne može repolarizirati, u decidualnim CD14⁺ stanicama inkubiranim s rastućim koncentracijama lipopolisaharida, određivali smo izraženost pro-upalnog citokina, IFN- γ . Utvrdili smo

da se količina stvorenog IFN- γ nije značajnije mijenjala, što potvrđuje našu hipotezu da su decidualne CD14⁺ stanice M2 aktivirani makrofagi koji djeluju protu-upalno u svom okruženju. Citokin IFN- γ ima protuvirusna, imunoregulacijska, i protu-tumorska svojstva. Smanjuje sposobnost predočavanja antigena, povećava lizosomsku aktivnost makrofaga, potiskuje Th2 imunološki odgovor, povećava izraženost molekula MHC razreda I na površini normalnih stanica, povećava prijanjajuća svojstva leukocita koja su nužna za njihovo kruženje, povećava aktivnost stanica NK, aktivira antigen predočne stanice i potiče Th1 staničnu diferencijaciju povećanjem transkripcijskog čimbenika T-bet i aktivira iNOS (156). Receptori za IFN- γ nađeni su na leukocitima (makrofagima), stanicama ekstraviloznog trofoblasta, endotelnim stanicama (335, 336) dok je IFN- γ nađen u decidui bazalis normalne trudnoće (260). Učinci IFN- γ u trudnoći su proturječni. S jedne strane IFN- γ olakšava apoptozu stanica izvanresičastog trofoblasta (337) dok s druge strane povećava izraženost HLA-C i HLA-G u manjoj mjeri na trofoblastnim stanicama štiteći ih na taj način od lize posredovane stanicama NK (338). U vrijeme implantacije stanice NK umnažaju i povećavaju lučenje IFN- γ kao odgovor na HLA-G pozitivne stanice (339), dok se kasnije u trudnoći njegovo stvaranje smanjuje (340). Ovaj rani, brzi i prolazni porast lučenja IFN- γ uzrokuje diferencijaciju regulacijskih limfocita T koje sprječavaju daljnju aktivaciju limfocita T utjecajem na antigen predočne stanice pomoću čimbenika kao što je IDO (341). Poznato je da su najznačajniji izvor IFN- γ stanice NK, međutim mogu ga lučiti i makrofagi u odgovoru na LPS (342). Naši rezultati pokazuju da i nakon primjene rastućih koncentracija lipopolisaharida ne dolazi do povećanja lučenja IFN- γ , što potvrđuje da su decidualne CD14⁺ stanice izrazito M2 aktivirane i ne mogu se repolarizirati u prisustvu čimbenika koji inače uzrokuju nastanak M1 makrofaga.

Općenito je mali broj istraživanja koje govore o vrsti citokina koje luče decidualni makrofagi. Ako se u obzir uzmu fenotipske osobitosti M2, pretpostavlja se da su ovi makrofagi alternativno (139, 308) aktivirani te bi kao takvi mogli lučiti i Th2 citokine. Citokin IL-4 pripada skupini Th2 citokina, koji ima brojne uloge kao što je stimulacija aktiviranih limfocita B, umnažanje limfocita T, smanjene citotoksičnosti stanica NK i limfocita T i diferencijacija CD4⁺ limfocita T u Th2 stanice. Pretpostavljalo se da je lučenje IL-4 ograničeno na limfocite, mastocite, bazofile i eozinofile, dok se smatralo da ga makrofagi ne luče. Alternativno aktivirani makrofagi luče IL-4 (342), koji je važan čimbenik u usmjeravanju limfocita T (342). Citokin IL-4 prisutan je u decidui i to značajno više u decidui parietalis nego u decidui bazalis što može rezultirati u različitoj citotoksičnosti stanica NK i citotoksičnih limfocita T u ova dva područja. U decidui parijetalis citotoksičnost je smanjena, dok je u decidui bazalis pojačana (260). Naši rezultati pokazuju da statistički značajno veći postotak (oko 15%) decidualnih CD14⁺ stanica luči IL-4 u odnosu na neznatan postotak stanica koje luče IFN- γ . Citokinski profil decidualnih CD14⁺ stanica govori u prilog njihovoj alternativnoj aktivaciji.

Nakon što smo pobliže fenotipski okarakterizirali decidualne CD14⁺ stanice te odredili njihov citokinski profil, odredili smo i kemokine koje ove stanice stvaraju i luče. U decidui je prisutan izrazito velik broj kemokina i njihovih receptora koji su tijekom implantacije i stvaranja posteljice odgovorni za uspostavljanje jedinstvenog imunološkog okoliša pomoću regrutiranja leukocita prisutnih tijekom trudnoće, prije svega makrofaga i stanica NK.

Kemokin CCL22 ili MDC (od engl. Macrophage derived chemokine) pripada obitelji CC kemokina i pored makrofaga luče ga dendritičke stanice nakon dodira s patogenima ili protu-CD40 protutijelom (283). Th2 citokini, kao što su IL-4 i IL-5, povećavaju njegovo lučenje dok ga Th1 citokini smanjuju. CCL22 potiče kruženje

dendritičkih i Th2 usmjerenih stanica, a povećan je u bolestima koje su udružene s Th2 imunološkim odgovorom kao što je atopijski dermatitis (283). Nalazi se izražen u endometriju tijekom sredine sekrecijske faze kao i tijekom rane trudnoće, a luči se većinom u decidualiziranoj stromi (276). Našim pokusima je utvrđen unutar stanica makrofaga. Na majčino fetalnom spoju mogao bi igrati značajnu ulogu u privlačenju Th2 stanica na mjesto upale i u nadziranju Th2 imunološkog odgovora sukladno ranijim nalazima. (283). Mogao bi imati ulogu u stišavanju blage kratkotrajne upalne reakcije nastale u vrijeme implantacije, tijekom prvog tromjesečja trudnoće.

Kemokin, CCL17 je također prisutan tijekom rane trudnoće na spoju majčinih i fetalnih tkiva (Tsuda, 2002). Luče ga pretežno stanice trofoblasta, epitelne stanice maternice i endometrijske žlijezde (287). Prema našim rezultatima samo 20% decidualnih CD14⁺ stanica luči CCL17. Međutim makrofagi nisu njegov glavni izvor u decidui rane trudnoće gdje je dokazan u izobilju i posreduje u novačenju CCR4⁺ limfocita T koji su Th2 usmjerenja u deciduu što je važno u održavanju trudnoće (287).

CCL3 je pro-upalni kemokin porijeklom iz makrofaga (284). Aktivira granulocite što dovodi do akutne upale posredovane neutrofilima. Potiče stvaranje i oslobađanje drugih pro-upalnih citkona kao što j IL-1, IL-6 i TNF- α iz fibroblasta i makrofaga. Utječe na kruženje stanica NK, povećava citotoksičnost stanica NK vjerojatno povećanjem oslobađanja perforina, povećava njihovo umnažanje i povećava lučenje drugih pro-upalnih kemokina u stanicama NK (285). Povećana izraženost ovog kemokina mogla bi biti udružena s povećanjem citotoksičnog potencijala decidualnih stanica NK što bi moglo negativno utjecati na ishod trudnoće. U endometriju je prisustvo ovog kemokina u obliku bjelančevine poznato odavno (286), iako Johnes i sur. pomoću metode RT-PCR (od engl. Reverse transcription polymerase chain reaction) nisu uspjeli dokazati njegovu mRNA tijekom endometrijskog ciklusa. Naši

rezultati pokazuju izraženost ovog kemokina u decidulanim CD14⁺ stanicama, međutim njegova izraženost je statistički značajno manja u usporedbi s lučnjem protu-upalnog CCL22. Ovo nam govori u prilog protu-upalnoj orijentaciji makrofaga u decidui.

Pro-upalni kemokin CXCL10 se luči u odgovoru na IFN- γ iz monocita, endotelnih stanica i fibroblasta, a veže se za CXCR3. Dokazan je u decidui kako na razini mRNA tako i na razini proteina. Djeluje kao kemoatraktant za monocite/makrofage, limfocite T, stanice NK i dendritičke stanice, pojačava adheziju limfocita T za endotelne stanice (343), ima protu-tumorsku aktivnost, a sprječava angiogenezu (344). CXCR10 je izražen na decidualnim stanicama NK i na CD16⁻ stanicama NK periferne krvi u znatno većoj količini, nego na CD16⁺ stanicama NK periferne krvi (197). To ukazuje na mogući mehanizam kojim se potiče novačenje regulacijskih, rađe nego citotoksičkih stanica NK iz periferne krvi u deciduu (197).

Naši rezultati pokazuju da makrofagi luče malu i gotovu podjednaku količinu Th2 kemokina CCL17 i Th1 CXCL10 kemokina, međutim u decidui CXCL10 ima značajnu ulogu u osiguravanju normalne organizacije decidualnih stanica NK, a makrofagi nisu glavni izvor ovog kemokina.

Mucini su konstitutivno prisutni u ženskom reproduktivnom sustavu uključujući maternicu, rodnicu, grlić maternice i jajovod. Izraženost u rodnici i grliću maternice je stalna i ne mijenja se tijekom endometrijskog ciklusa što upućuje na ulogu u zaštiti od različitih patogena (345). Na takvo razmišljanje ukazuje spoznaja da miševi kojima nedostaje gen za MUC1 pokazuju sklonost prema bakterijskim infekcijama (346). Međutim, u maternici MUC1 potiskuje međudjelovanje između zametka koji se implantira i majčinih endometrijalnih adhezijskih molekula čineći tako prepreku implantaciji (345). Polarizirane stanice endometrija su trajno smanjene prijemljivosti

dok izražavaju mucine na površini. Enzimatsko otcjepljivanje mucina dovodi do pretvorbe decidualizirane sluznice maternice u funkcionalno prijemljivo stanje, a miševi kojima nedostaje gen za MUC1 pokazuju trajno prijemljiv endometriju (345). MUC1 se uklanja s površine epitelnih stanica smještenih ispod ili u neposrednoj blizini mjesta implantacije, dok sveopće smanjenje izraženosti MUC1 nije potrebno za uspješnu implantaciju.

Molekularni mehanizmi koji nadziru izraženosti MUC1 nisu u potpunosti poznati. Analiza MUC1 promotora otkrila je brojna potencijalna vezna mjesta za čimbenike koji reguliraju prepisivanje kao što su GC, Sp1 i receptori za estrogene te mjesta za vezanje progesterona (347). Spolni hormoni bi na taj način mogli biti uključeni u nadziranje prepisivanja gena za MUC1 bilo izravnim međudjelovanjem s promotorom za MUC1 ili neizravno, poticanjem ili potiskivanjem drugih transkripcijskih čimbenika (348). Mucin1 mRNA i izraženost MUC1 bjelancevine povećava se tijekom priljubljivanja blastociste, ali se smanjuje na mjestu implantacije (55). Ne zna se točan mehanizam koji omogućuje njegovo smanjenje, ali se smatra da citokini kao što je IL-1 β i njegovi receptori doprinose nadziranju izraženosti MUC1 kako bi omogućili međudjelovanje između zametka i endometrija (349).

Naša istraživanja polaze od činjenice da u normalnoj trudnoći dolazi do uklanjanja MUC1 s površine epitelnih stanica, dok njegova izraženost u ranoj trudnoći može dovesti do poremećaja implantacije. Zaista metodom imunohistokemije nismo mogli dokazati MUC1 glikoprotein na majčino-fetalnom spoju normalne eutopične trudnoće u prvom tromjesečju u odnosu na pozitivnu kontrolu tj. izražavanje MUC1 u tumorima jajnika. Naime, MUC1 nalazi se izražen u normalnom tkivu jajnika (345) i nemalignim epitelnim tumorima ovarija (350), međutim znatno je jače izražen kod endometrioidnog adenokarcinoma, mucinoznog cistadenokarcinoma i seroznog cistadenokarcinoma jajnika (350).

Manozni receptor sadrži domenu za prepoznavanje ugljikohidrata te može vezati i unositi MUC1 u stanicu na način ovisan o koncentraciji. To je u skladu s ranije objavljenim rezultatima naše grupe, koji govore o vezanju i internalizaciji TAG-72 glikoproteina za površinu decidualnih CD14⁺ makrofaga posredstvom manoznog receptora (60). Zanimljivo je da MUC1 slično kao i mannan koji je specifičan ligand za ugljikohidratnu domenu (66), čak i u najvišim koncentracijama ne može u potpunosti zaustaviti ulazak FITC-dekstrana u decidualne CD14⁺ stanice, iako postoji statistički značajno smanjenje. To je najvjerojatnije posljedica ulaska FITC-dekstrana u stanicu alternativnim putevima koji nisu ovisni o vezanju za manozni receptor (351). Ovi alternativni putevi pojačavaju se u uvjetima kada su klasični receptori za endocitozu iz bilo kojeg razloga onemogućeni (352) ili zasićeni prirodnim ligandima (glikoproteinima). Endogeni glikoproteini bi na taj način mogli utjecati na sazrijevanje makrofaga, njihov fenotip i funkcije.

Istraživali smo utjecaj MUC1 na izražaj površinskih biljega koji su vezani s predočavanjem antigena, CD80, CD86, HLA-DR, CD83, te receptora mamilica D6 i IL-1RII za proupalne kemokine i IL-1 na površini decidualnih makrofaga. Pokazali smo da nema razlike u izražavanju površinskih biljega CD80, CD86, HLA-DR, CD83 i receptora mamilice D6 između CD14⁺ kultiviranih u mediju i onih kultiviranih u prisustvu MUC1. Međutim, decidualne CD14⁺ stanice kultivirane s MUC1 izražavaju statistički značajno više IL-1RII. Citokin IL-1 je jedan od glavnih upalnih citokina koji je prisutan na spoju majčinih i fetalnih tkiva, javlja se kao IL-1 α i IL-1 β , a luče ga trofoblastne i decidualizirane stanice (353). Veže se za dva receptora koji su označeni kao IL-1RI (IL-1RI) i IL-1 RII. Interleukin-1RI nalazi se na endometrijskim epitelnim stanicama i stanicama trofoblasta, dok je IL-1RII izražen pretežno na leukocitima (353, 354). Vezanje IL-1 za IL-1RI dovodi do prenošenja aktivacijskih signala u stanicu. Nasuprot tome, IL-1RII nema sposobnost prenošenja unutarstaničnih signala te je nazvan receptorom mamilicom. Njegova izvanstanična domena može se

odvojiti od stanične površine, vezati IL-1 i na taj način spriječiti njegovo vezanje za funkcionalni receptor te time doprinosi stišavanju upale (355). Citokin IL-1 ima značajnu ulogu u implantaciji. Povećava lučenje prostaglandina, estradiola i čimbenika LIF, a potiče aktivnost matriks metaloproteinaze-9 u stanicama trofoblasta. Onemogućavanje aktivacije IL-1R tip I pomoću IL-1 receptor antagonista (IL-1 RA) potiskuje implantaciju u miša (356). Interleukin-1 prisutan je u humanom endometriju i na spoju majčinih i fetalnih tkiva tijekom implantacije. Sustav IL-1 mogao bi biti uključen u nadziranje stvaranja i lučenja Th1/Th2 citokina budući da utječe na stvaranje IFN- γ u stanicama NK i limfocitima T. Dimitriadis E, (272.) navodi da IL-1 vjerojatno može pogodovati implantaciji. Međutim, Horn i suradnici nisu uspjeli dokazati izravan utjecaj IL-1 β na izraženost MUC1, ali postoji mogućnost da utječe na signale iz stromalnih stanica endometrija, koje potom utječu na izraženost MUC1 (348). Naši „in vitro“ pokusi dokazuju da MUC1 statistički značajno povećava izraženost IL-1RII na makrofagima, a nedostatkom MUC1 na mjestu implantacije stvaraju se uvjeti za blagu pro-upalnu reakciju poželjnu za peri-implantacijsko razdoblje.

U suvremenoj znanstvenoj literaturi ne postoji dovoljno dokaza da li je prijemljivost endometrija jedina posljedica uklanjanja MUC1 s mjesta implantacije. Mi smo pretpostavili da jedan od mehanizama uklanjanja MUC1 jest vezanjem i internalizacijom putem endocitoznih receptora, koji sadržavaju domenu za prepoznavanje ugljikohidrata, a izraženi su na antigen predočnim stanicama, koje obilno naseljavaju deciduu rane trudnoće. MUC1 je prisutan na apikalnoj površini žljezdanih i površinskih epitelnih stanica, a smještaj antigen predočnih stanica je u blizini decidualnih žlijezda, što predstavlja preduvjet za njihovo međudjelovanje.

Endogeni glikoproteini bi na taj način mogli biti uključeni u poticanje stvaranja i lučenja različitih citokina i kemokina u decidualnim CD14⁺ stanicama, koji su neučinkoviti u podržavanju Th1 staničnog odgovora, kao što je pokazano za cito/kemokinsko lučenje makrofaga u okolini mucinoznih tumora (62, 72) ili dendritičkih stanica diferenciranih in vitro iz monocita pod utjecajem PAM-1 mAb usmjerenog prema domeni za prepoznavanje ugljikohidrata (66). U takvom okruženju stanicama posredovana imunost je smanjena. Limfociti T, stimulirani s mijeloidnim dendritičkim stanicama, koje su diferencirane u prisustvu PAM-1 protutijela, postaju anergični (66). Nadalje, nishodno regulirani mehanizmi stanicama posredovane imunosti su svojstveni za mukozne površine bogate glikoproteinima (357) poput sluznice probavne cijevi, ali nisu osobitost decidue u implantacijskom razdoblju, koji je udružen s blagim pro-upalnim imunološkim odgovorom pogodnim za implantaciju (67). To navodi na zaključak da bi uklanjanje MUC1 s površine endometrija doprinosilo preusmjeravanju iz Th1 u Th2 imunološki odgovor, pogodan za održavanje trudnoće već u prvom tromjesečju.

Aktivacija manoznog receptora pomoću PAM-1 monoklonskog protutijela usmjerenog prema regiji za prepoznavanje ugljikohidrata na mijeloidnim dendritičkim stanicama potiče stvaranje velikih količina CCL17 i CCL22 (66). To su liganadi za CCR4 koji je izražen na Th2 usmjerenim limfocitima T, (66). Za razliku od LPS stimuliranih dendritičkih stanica, dendritičke stanice nakon aktivacije manoznog receptora PAM-1 protutijelom nisu sposobne stvarati CXCL10, ligand za CXCR3 koji je izražen na Th1 limfocitima i stanicama NK kao ni CCL19, ligand za CCR7. Kemokin CCL19 utječe na kruženje naivnih limfocita T, izvršnih limfocita T i zrelih limfocita T kroz sekundarne limfne organe. Stoga, dendritičke stanice koje su stimulirane s PAM-1 monoklonskim protutijelom ne samo da nisu sposobne stvarati kemokine koji su odgovorni za kruženje Th-1 limfocita, već aktivno luče kemokine koji privlače Th-2 stanice i regulacijske limfocite T koji potiskuju Th-1 imunološki odgovor (66).

Sukladno tome, pretpostavili smo da bi aktivacija manoznog receptora na decidualnim makrofagima mogla dovesti do sličnih učinaka na lučenje kemokina. Međutim, u našim pokusima MUC1 nije mijenjao lučenje CCL3, CCL17 i CCL22 u decidualnim CD14⁺ stanicama. To je u skladu s rezultatima Jamamota i suradnika (358) koji su pokazali da vezanje *Candida albicans*, čija je površina bogata manozom, ne utječe na postojeće stvaranje i lučenje kemokina, iako povećava stvaranje citokina IL-1 β , IL-6 i GM-CSF. Pretpostavlja se da aktivacija manoznog receptora aktivira grupe gena uključenih u lučenje citokina, međutim lučenje kemokina je nadzirano vjerojatno putem nekih drugih receptora (358).

U našim istraživanjima pokazali smo da vezanje MUC1 ne dovodi do promjene u stvaranju IL-4 i IFN- γ u makrofagima, međutim dovodi do statistički značajnog sniženja u lučenju IL-15. Slično, TAG-72 smanjuje stvaranje IL-15 i IFN- γ u decidualnim CD1a⁺ stanicama djelujući protu-upalno (65). To potvrđuje nalaz smanjenog izražaja IFN- γ u naivnim alogeničnim limfocitima T iz krvi pupkovine i singeničnim decidualnim limfocitima T nakon kultiviranja s makrofagima koji su prethodno potaknuti s TAG-72 (65). Ovaj učinak je prisutan i uz dodatak lipopolisaharida, iako je lipopolisaharid povezan sa snažnim poticanjem Th1 imunološkog odgovora (359). Decidualni makrofagi luče neznatne količine pro-upalnog IFN- γ , a MUC1 nije mogao utjecati na stvaranje IFN- γ u decidualnim makrofagima. Ove stanice čak i u prisustvu lipopolisaharida ne mogu povećati stvaranje IFN- γ , kao što ne mogu smanjiti sposobnost endocitoze FITC-dextrana, kao posljedica nishodne regulacije manoznog receptora s površine stanica u znak pro-upalne aktivacije. To značajno ukazuje da su ove stanice izrazito M2 aktivirane i ne mogu se repolarizirati čak ni u prisustvu snažnog čimbenika koji potiče nastanak M1 makrofaga pro-upalne usmjerenosti (95).

Citokin IL-15 je prisutan u sluznici maternice i utječe na citotoksičnost i umnožavanje decidualnih CD56^{bright} stanica NK, što je pokazano za IL-2 u velikim koncentracijama in vitro (68). Međutim, IL-2 nikad nije pronađen na mjestu implantacije (335), stoga se smatra da IL-15 ima značajnu ulogu u nadziranju stanica NK (68). Interleukin-15 mRNA kao i njegova bjelančevina prisutni su u endometriju žena koje nisu trudne, decidui i posteljici (68), a mRNA za IL-15R α prisutna je u obilju u stanicama NK, makrofagima, u koriokarcinomskim staničnim linijama te u različitim tkivima kao što je jetra, srce, slezena, pluća, poprečnoprugasta mišićna tkiva te endotelnim stanicama krvnih žila (360). Podjedinica IL-15R α lanca bjelančevine nađena je u decidualnim stanicama NK zajedno s IL-2R β i IL-2R γ lancima koji služe za prijenos signala u stanicu (68). Citokin IL-15 potiče umnažanje decidualnih CD56^{bright} stanica NK na način koji je ovisan o koncentraciji (Verma, 2000). Manje potiče umnažanje CD56^{dim+} stanica NK (68). U procesu sazrijevanja stanica NK iz nezrelih timocita, IL-15 povećava izraženost CD94/NKG2A, ali ne i KIR molekula (361). CD56^{bright+} stanice NK periferne krvi su CD94/NKG2A⁺, ali negativne za KIR. Suprotno tome, u decidui NK stanice izražavaju KIR specifične za HLA-C molekule (362). Interleukin -15 u kombinaciji s čimbenikom zametnih stanica (Stem cell factor-SCF) potiče sazrijevanje stanica NK iz nezrelih CD34⁺CD7⁻, u CD56⁺CD3⁻ stanice. Povećava također citotoksičnost stanica NK prema K562 staničnoj liniji slično kao i IL-2. Međutim, dok IL-15 stimulira stanicama NK posredovano ubijanje koriokarcinomske linije JEG-3, dotle se njihova citotoksičnost prema trofoblastnim stanicama ne mijenja što može biti posljedica promjene u izraženosti NKp44 i NK46 receptora nakon kultivacije s IL-2 ili IL-15 (68). Citokin IL -15 je specifičan po tome što povećava umnažanje decidualnih stanica NK, ali istovremeno ih ne preobražava u moćne citolitičke stanice koje su sposobne uništiti stanice trofoblasta, što je prikladna funkcija za citokin koji je prisutan tijekom rane trudnoće na spoju majčinih i fetalnih tkiva (68). U našim istraživanjima dokazali smo da MUC1 utječe na lučenje IL-15 u decidualnim stanicama dovodeći do njegovog smanjenja. Ovime smo pokazali da MUC1 putem

manoznog receptora može oblikovati imunološki odgovor promjenom u lučenju jednog od citokina koji je od presudne važnosti u sazrijevanju i umnažanju stanica NK kao najbrojnije leukocitne populacije u decidui rane trudnoće.

S ciljem istraživanja utjecaja decidualnih makrofaga na autologne decidualne stanice NK razvili smo in vitro metodu oplemenjivanja CD14⁺ stanica iz suspenzije decidualnih adherentnih stanica. Kako bismo uklonili značajni mogući utjecaj dendritičkih stanica u pokusima kokultivacije decidualnih CD14⁺ stanica sa stanicama NK, CD14⁺ stanice korištene u istražavanjima dobivene su nakon uklanjanja CD1a⁺ stanica iz suspenzije decidualnih adherentnih stanica pozitivnim magnetskim izdvajanjem. Adherentne populacije decidualnih stanica obuhvaćaju stromalne stanice koje čine 70-80%, makrofage (5-10%), žlijezdane, trofoblasne i dendritičke stanice koje zajedno čine 1-10% (363). Iz adherentnih populacija CD1a negativnih stanica izdvojili smo CD14⁺ stanice pozitivnim magnetskim izdvajanjem i postigli smo čistoću od 70-85%.

Obilježavanje decidualnih CD56⁺ stanica in situ metodom imunohistokemije, ukazala su na njihov smještaj u blizini spiralnih arterija i žlijezda (116). Makrofagi, koji se također nalaze oko žlijezda i arterija, nalaze se i u blizini izvanresičastog citotrofoblasta, stupaju u međudjelovanje s trofoblasnim populacijama i prodiru u spiralne arteriole u decidui bazalis i miometriju (116, 117). Oni se također nalaze u bliskom dodiru s decidualnim stanicama NK (302), što predstavlja dobar preduvjet za njihovo međudjelovanje. Stanice NK mogu se aktivirati nakon dodira s decidualnim CD14⁺ stanicama (364).

Antigen predočne stanice stupaju u dodir sa stanicama NK putem različitih receptora. Zanimljiva je međudjelovanje između CD209⁺ stanica i stanica NK (58). Molekula CD209 pokazuje visoki afinitet za ICAM-3 te se međustanični dodir ostvaruje

vjerojatno međudjelovanjem ovih receptora. Vezanje ICAM-3 s CD209 moglo bi spriječiti međudjelovanje CD209 s limfocitima T te dalje ometati sazrijevanje CD209⁺ antigen predočnih stanica u potencijalno imunostimulatorne dendritičke stanice (58). Stanice NK, zapravo, luče veliki broj citokina, posebice GM-CSF i IL-10 koji su snažni u poticanju sazrijevanja dendritičkih stanica. S druge strane međudjelovanje CD209⁺ antigen predočnih stanica sa stanicama NK može dovesti do aktivacije, pa čak i umnažanja stanica NK (302).

Stanice NK osim svoje citotoksične aktivnosti, imaju ulogu i u lučenju citokina. U decidui rane trudnoće prisutne su malobrojne stanice NK koje luče IL-4. Međutim, zbog relativno malog broja, učinak makrofaga kultiviranih s MUC1 ili u mediju ne mogu značajno utjecati na lučenje IL-4. Osim toga, ovi bi makrofagi sami trebali lučiti velike količine IL-4 kako bi mogli ostvariti ovaj učinak na stanice NK, a prema našim rezultatima 14% decidualnih CD14⁺ stanica luči ovaj citokin. Makrofagi nemaju sposobnost potaknuti Th1 ili Th2 orijentaciju kao dendritičke stanice, ali je mogu učinkovito podržavati (115). Tako MUC1 stimulirani makrofagi mogu podržavati stvaranje CCL17 u decidualnim CD56⁺ stanicama, koji služi privlačenju Th2 usmjerenih limfocita. Uklanjanje MUC1 s mjesta implantacije smanjuje stvaranje CCL17 u stanicama NK što uzrokuje prevlast pro-upalnih citokina, posebice kada se uzme u obzir da MUC1 ne utječe na izražaj drugog Th2 kemokina, CCL22, niti pro-upalnog kemokina CCL3.

U našim istraživanjima pokazali smo da decidualne NK stanice kultivirane u prisustvu decidualnih CD14⁺ stanica održavaju visoku razinu perforina, FasL i TRAIL-a kao i svježe izolirane decidualne stanice NK. Tijekom 18-satne kultivacije decidualne stanice NK smanjuju unutarstaničnu količinu perforina i ostalih citolitičkih medijatora. Međutim, kada su decidualne stanice NK kultivirane s decidualnim CD14⁺ stanicama koje su preretirane s MUC1, decidualne stanice NK ne

moгу održati visoku razinu citolitičkih medijatora te dolazi do njihovog pada kao i kod stanica koje su kultivirane samo u mediju. Također smo dokazali da CD56⁺ stanice kultivirane u prisustvu magnetskim izdvajanjem obogaćenom populacijom CD14⁺ stanica kroz 48 sati u omjeru 1:2 povećavaju proliferiraju do gotovo 60%, dok dodatak MUC1 u koncentraciji 200 µg/ml, statistički značajno smanjuje proliferaciju CD56⁺ stanica. Makrofagi stimulirani s MUC1 jače su lizirani budući da ovako tretirani makrofagi ne mogu održavati blagi proupalni odgovor utjecajem na cito/kemokinsku mrežu, niti na citolitičke medijatore pa se vjerojatno ne može vršiti dobar nadzor trofoblastnog rasta i decidualnih leukocitnih subpopulacija u decidui (72). Osim toga, makrofagi stimulirani s MUC1 in vitro, vjerojatno kao i makrofagi in vivo koji internalizacijom uklanjaju MUC1 s epitela žlijezda, mogu biti učinkovitije ubijeni jer nisu podobni za kontrolu rasta trofoblasta budući da ne mogu izazvati proupalni imunološki odgovor, proliferaciju stanica NK te održati visoku razinu citotoksičnih medijatora (perforin, FasL i TRAIL).

Makrofagi su stanice koje predstavljaju najveći dio populacije HLA-DR⁺ stanica u decidui, a naši raniji rezultati ukazuju da su HLADR⁺ stanice odgovorne za održavanje perforina u decidualnim limfocitima nakon 18 sati kulture in vitro (70). Učinak je posredovan IL-15, jer protu-IL-15 uklanjaju tu sposobnost HLA-DR⁺ stanica (70). Dokazali smo ranije da MUC1 utječe na lučenje IL-15 u decidualnim CD14⁺ stanicama tako da dovodi do smanjenja njegovog stvaranja, dok je razina IL-15 u netretiranim stanicama relativno visoka. Iz ovog proizlazi da MUC1 utječe na imunološki učinak decidualnih makrofaga na stanice NK. Dovodeći do sniženja razine IL-15 u decidualnim makrofagima, MUC1 neizravno dovodi do nemogućnosti održavanja visoke razine citotoksičnih medijatora i proliferacije CD56⁺ stanica što dalje može imati posljedice na održavanje trudnoće.

MUC1 kao prirodni ligand za ugljikohidratnu domenu manoznog receptora sposoban je ujecati na CD14⁺ makrofage da luče specifični profil citokina i kemokina koji nisu sposobni održavati Th1 posredivani imunološki odgovor i dovodi do smanjenja citotoksičnog potencijala stanica NK što bi moglo dovesti do nedovoljnog rasta trofoblastnih stanica (72). U takvim slučajevima trofoblast bi mogao dublje prodirati u decidualiziranu uterinu stromu i/ili u sistemsku cirkulaciju ugrožavajući na taj način ishod trudnoće. Ovo bi moglo objasniti barem jedan od razlog zbog kojeg MUC1 mora biti uklonjen sa spoja majčinih i fetalnih tkiva gdje bi trebala postojati odgovarajuća kontrola prodiranja trofoblastnih stanica posredovana stanicama NK (72). Kada ne postoji tolerogeni učinak mucina na antigen predočne stanice, one mogu podržavati blagu pro-upalnu reakciju povećanjem stvaranja i lučenja IL-15. Citokin IL-15 je najraniji i najvažniji čimbenik u umnažanju, diferencijaciji i sazrijevanju stanica NK pa bi povećanje broja i citolitičkog potencijala stanica NK, do kojeg dolazi tijekom ko-kultivacije stanica NK i CD14⁺ makrofaga, moglo biti posljedica učinka povećanog lučenja IL-15 u decidualnim makrofagima. Ovo je sukladno činjenici da se stanice NK intenzivnije nakupljaju u decidui tijekom rane trudnoće u usporedbi s endometrijem sekrecijske faze endometrijskog ciklusa koji je obogaćen mucinima (365).

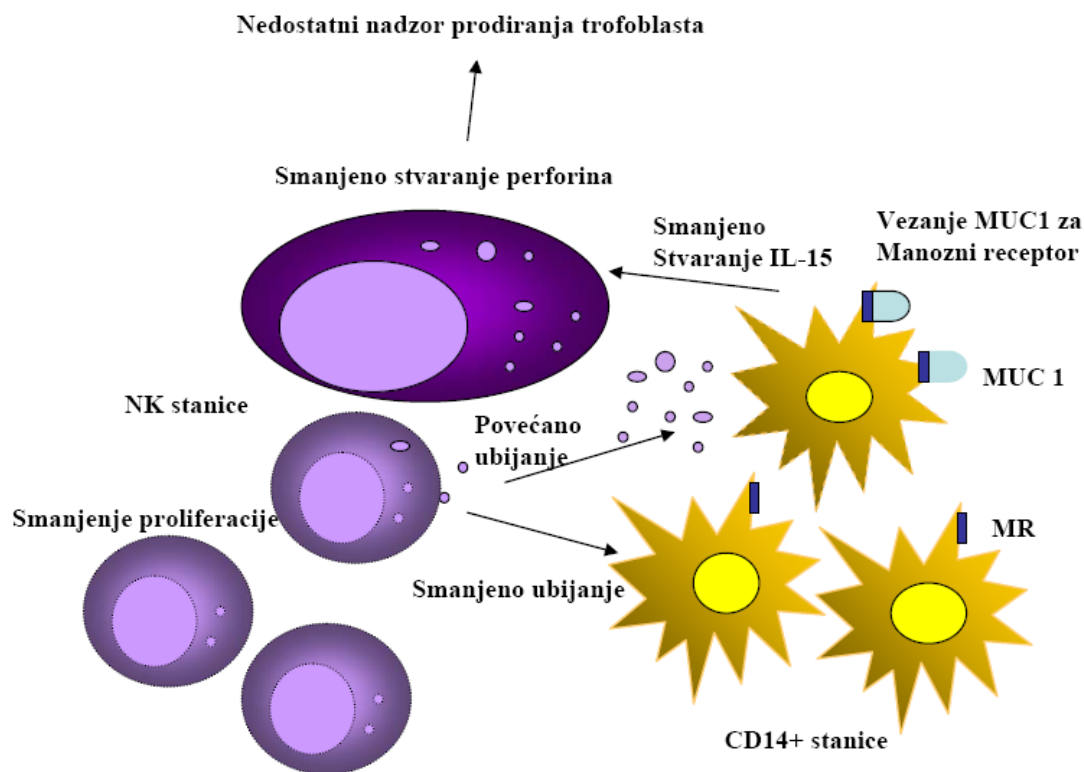
S druge strane, pretpostavlja se da su glikoproteini kao što su MUC1 i TAG-72 izraženi na epitelnim stanicama, u neposrednoj blizini mjesta implantacije kod ektopičnih trudnoća unutar jajovoda te mogu doprinjeti dubljem prodiranju trofoblastnih stanica u stijenku jajovoda, kao što su pokazali von Rango i suradnici (260). Značajno smanjenje broja stanica NK u jajovodu na mjestu implantacije, kao što je pokazao veći broj istraživanja, mogao bi nastati kao posljedica lokalnog djelovanja antigen predočnih stanica u prisustvu mucina (72).

Iz ovog proizlazi da nestanak MUC1 i TAG-72 s mjesta implantacije vjerojatno pridonosi većem stvaranju i lučenju IL-15, jačoj infiltraciji decidualnih stanica NK koje su bogate citolitičkim medijatorima kao što je perforin. Naša prethodna istraživanja na materijalu dobivenom iz jajovoda ektopičnih trudnoća doprinosi razumijevanju utjecaja mucina na trudnoću. U ektopičnoj trudnoći na mjestu implantacije, te nedaleko od njega, prevladavajuća leukocitna populacija su CD3⁺ stanice dok nisu nađeni endometrijalni granulirani limfociti. Invazija trofoblastnih stanica može dovesti čak do penetracije kroz stijenku jajovoda (71).

Decidualne stanice NK izražavaju osebujnu kombinaciju NK receptora pod utjecajem tkivnih čimbenika, posebice IL-15, s ciljem da ne ubiju stanicu trofoblasta, ali da mogu regulirati udio imunokompetentnih stanica u decidui i lučiti citokine. Tako CD56⁺ stanice NK ubijaju učinkovito CD14⁺ makrofage i osiguravaju da se ne razvije jaka upala tijekom trudnoće. Prema našim rezultatima ubijanje CD14⁺ stanica posredovano je NKP 46, NKp 44 i NKp 30 receptorima, dok MICA/B-NKGD mehanizam nije uključen. Blokiranje učinaka perforina u potpunosti sprječava ubijanje, što je i objašnjenje značajno velike izraženosti perforina u stanicama NK. Spielman i suradnici (153) su pokazali da stanice NK i limfociti T kojima nedostaje gen za perforin i FasL, nisu sposobne ukloniti antigen predočne stanice što dovodi do trajnog ponavljano poticanja i umnažanja citotoksičnih limfocita T i antigen predočnih stanica, što na kraju dovodi do prevlasti pro-upalnog Th1 odgovora (153). Ovo je sukladno nalazu da je perforin uključen u ubijanje aktiviranih makrofaga, što se može zaključiti i iz činjenice da miševi kojima nedostaje gen za perforin i FasL razvijaju upalu maternice i jajovoda s izrazitim umnažanjem makrofaga (153).

I na kraju, neobični nestanak MUC1 i TAG-72 s mjesta implantacije tijekom normalne trudnoće i njihova prisutnost u neposrednoj blizini mjesta implantacije tijekom ektopične trudnoće zajedno s ulogom mucina tijekom tumorogeneze govore u prilog

uloge mucina u imunološkoj regulaciji, posebice u kontroli prodiranja stanica. Vezanje mucina za ugljikohidratnu domenu manoznog receptora na površini antigen predočnih stanica dovodi do preusmjerenja imunološkog odgovora promjenom u lučenju IL-15 koji je uključen u regulaciji umnažanja i funkcije stanica NK kao što prikazuje Slika 38.



Slika 38. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja MUC1 na spoju majčinih i fetalnih tkiva. Vezanje MUC1 za manozni receptor na površini CD14⁺ stanica dovodi do smanjenog stvaranja IL-15 što uzrokuje smanjenje izražaja perforina u decidualnim stanicama NK. Ovo rezultira u nedovoljnom nadzoru prodiranja trofoblasta i posljedičnom dubljem prodiranju kao u slučaju tubarne trudnoće. Smanjenje proliferacije stanica NK zajedno sa smanjenim izražajem perforina dovodi do smanjenog ubijanja CD14⁺, dok se pojačano ubijaju CD14⁺ stanice koje su vezale MUC1. Nedostatno ubijanje CD14⁺ stanica dovodi do njihovog nagomilavanja u decidui i oštećenja spoja majčinih i fetalnih tkiva.

6. ZAKLJUČAK

1. Decidualne CD14⁺ stanice i CD14⁺ stanice periferne krvi trudnih žena u prvom tromjesečju trudnoće izražavaju u zanemarivom postotku CD1a i CD83 biljege, što ih razlikuje od dendritičkih stanica i označuje kao posebne populacije decidualnih makrofaga, odnosno monocita periferne krvi.

2. Analiza fenotipskih osobitosti decidualnih CD14⁺ stanica, njihovog stvaranja i lučenja citokina i/ili kemokina ukazuje da decidualne CD14⁺ stanice predstavljaju subpopulaciju stanica različitu od onih periferne krvi koja bi se prema slijedećim osobitostima mogle svrstati u subpopulaciju tzv. M2 ili alternativno aktiviranih makrofaga:

a) decidualni CD14⁺ makrofagi ne izražavaju molekulu CD16, dok u znatno većem postotku izražavaju receptor mamilicu CD163 i endocitne receptore CD206 i CD209 u odnosu na monocite periferne krvi.

b) decidualne stanice izražavaju značajno više CCR5 na svojoj površini u usporedbi s monocitima periferne krvi trudnih žena što ukazuje da se u deciduu regrutiraju CD14⁺ stanice periferne krvi sposobne putovati prema pro-upalnim kemokinima koji se stvaraju na majčino-fetalnom spoju tijekom rane trudnoće.

c) Decidualne CD14⁺ stanice stvaraju u citoplazmi statistički značajno više protu-upalnog citokina IL-4 nego pro-upalnog IFN- γ .

d) decidualne CD14⁺ stanice stvaraju u citoplazmi statistički značajno više protu-upalnog kemokina CCL22 u odnosu na pro-upalni kemokin CCL3, ali i protu-upalni CCL17.

e) decidualne CD14⁺ stanice luče podjednaku količinu protu-upalnog CCL17 i pro-upalnog CXCL10 koji u decidui osigurava normalni raspored stanica NK.

3. Alternativna aktivacija decidualnih makrofaga očituje se u odgovoru decidualnih CD14⁺ stanica prema lipopolisaharidu na slijedeći način:

- a) decidualne CD14⁺ stanice ne mogu povećati endocitozu FITC-dekstrana nakon stimulacije s rastućom koncentracijom lipopolisaharida (1-100 µg/ml),
 - b) decidualne CD14⁺ stanice ne mogu povećati izražaj endocitnog receptora CD206 nakon stimulacije s 10 µg/ml lipopolisaharida,
 - c) decidualne CD14⁺ stanice ne mogu povećati stvaranje pro-upalnog IFN-γ po stimulaciji s rastućom koncentracijom lipopolisaharida (1-100 µg/ml) i ukazuje da ih čimbenici koji klasično potiču Th1 odgovor ne mogu repolarizirati.
4. Decidualne CD14⁺ stanice koje izražavaju endocitni receptor CD209 smještene su uglavnom u neposrednoj blizini žlijezda što stvara preduvjet za međudjelovanje s mucinima koje luči žljezdani epitel.
 5. Mucin1 nije izražen u decidualnom tkivu prvog tromjesječja drave trudnoće.
 6. Decidualne CD14⁺ stanice prvog tromjesječja normalne trudnoće prethodno stimulirane s Mucinom1 (25-200 µg/ml) smanjeno vežu protutijela usmjerena k domenama za prepoznavanje ugljikohidrata usmjerenih prema CD206 i CD209 receptorima za endocitozu na način ovisan o koncentraciji MUC1, što ukazuje da decidualni makrofazi vežu MUC1 regijom za prepoznavanje ugljikohidrata in vitro.
 7. Decidualne CD14⁺ stanice prvog tromjesječja normalne trudnoće prethodno stimulirane s mucinom-1 (25-200 µg/ml) smanjenom učinkovitošću internaliziraju FITC-dextran na način ovisan o koncentraciji mucina-1, jednako kao što to čine nakon stimulacije s rastućom koncentracijom manana koji je specifičan ligand za domenu koja prepoznaje ugljikohidrate u receptorima za endocitozu i ukazuje da decidualne CD14⁺ stanice internaliziraju Mucin1.
 8. Decidualne CD14⁺ stimulirane s mucinom-1 (200 µg/ml) tijekom 18 sati statistički značajno ushodno reguliraju IL-1R II na svojoj površini, dok ne mijenjaju bitnije izražaj ostalih kostimulacijskih molekula CD80 i CD86, aktivacijskih molekula CD83 i HLA-DR te receptora mamilice D6.

9 Decidualne CD14⁺ stimulirane s mucinom-1 (200 µg/ml) tijekom 18 sati statistički značajno smanjuju unutarstanično stvaranje IL-15 u odnosu na stanice kultivirane samo u mediju za kulturu, dok ne utječe na lučenje IL-4, IL-10, IL-18 i IFN-γ citokina kao ni CCL3, CCL17 i CCL22 kemokina.

10. Razradili smo protokol za izdvajanje i pročišćavanje CD14⁺ makrofaga iz decidualnog tkiva prvog tromjesečja zdrave trudnoće koristeći pozitivno magnetsko izdvajanje stanica iz decidualnih adherentnih stanica dobivenih enzimatskom razgradnjom tkiva i kultivacijom in vitro. Čistoća obogaćene populacije decidualnih CD14⁺ stanica od 70% omogućava nam da učinke na decidualne CD56⁺ stanice u daljnjim pokusima ko-kulture in vitro možemo s velikom vjerojatnošću pripisati decidualnim makrofagima.

11. Decidualne CD14⁺ stanice, nestimulirane ili stimulirane s mucinom-1 (200 µg/ml) tijekom 5 sati, nisu utjecale na unutarstanično stvaranje protu-upalnog citokina IL-4 i pro-upalnog citokina IFN-γ u pročišćenim decidualnim CD56⁺ stanicama NK u omjeru 1:5 nakon 18 h kulture in vitro te se postotak IL-4⁺ i IFN-γ⁺ stanica NK nije statistički značajno razlikovao od istovrsnih stanica kultiviranih samo u mediju ili u mediju uz prisustvo iste koncentracije mucina-1.

12. Nestimulirane decidualne CD14⁺ stanice smanjile su statistički značajno izražaj protu-upalnog CCL17 u pročišćenim decidualnim CD56⁺ stanicama NK u omjeru 1:5 nakon 18 h kulture in vitro, u odnosu na stanice kultivirane samo u mediju i stanice ko-kultivirane s decidualnim CD14⁺ stanicama stimuliranim s mucinom-1 (200 µg/ml). Postotak stanica NK koje izražavaju CCL3 i CCL22 nije se statistički značajnije mijenjao nakon 18 sati kulture s nestimuliranim ili mucinom-1 stimuliranim stanicama NK te od istovrsnih stanica kultiviranih samo u mediju za kulturu ili u mediju uz prisustvo iste koncentracije mucina-1.

13. Nestimulirane decidualne CD14⁺ stanice statistički značajno povećavaju postotak autolognih CD56⁺ stanica NK koje izražavaju perforin, TRAIL i Fas-L u omjeri 1:5

nakon 18 sati kulture in vitro, dok CD14⁺ stanice kultivirane u prisustvu MUC1 nisu učinkovite u održavanju navedenih medijatora u kulturi.

13. MUC1 neizravno utječe na proliferaciju decidualnih CD56⁺ stanica NK, budući da decidualne CD56⁺ stanice NK prvog tromjesječja normalne trudnoće proliferiraju manje učinkovito nakon kulture s autolognim decidualnim CD14⁺ stanicama prethodno stimuliranim s MUC 1 u omjeru 1:2 nakon 48 sati u CFSE testu proliferacije, nego nakon kulture s nestimuliranim decidualnim CD14⁺ stanicama.

14. Iz svježe suspenzije DMS, 90-100% decidualnih CD56⁺ stanica izražava NKp46 i CD94 receptore s aktivacijskim, odnosno aktivacijsko/inhibicijskim svojstvima, 70-90% izražava aktivacijski NKG2D homodimer i inhibicijski NKG2A receptor, NKG2C izražava 20-30% stanica NK, dok njih 20% izražava NKp30 i NKP44 receptore.

15. Decidualne NK stanice učinkovito ubijaju decidualne CD14⁺ stanice na način ovisan o koncentraciji i citotoksičnom medijatoru perforinu, jer protu-perforinska protutijela statistički značajno smanjuju citotoksičnost CD56⁺ stanica prema autolognim CD14⁺ makrofagima.

16. Citotoksična aktivnost decidualnih stanica NK prema autolognim CD14⁺ makrofagima, podstaknuta je ligandima za NK receptore NKp30, NKp44 i NKp46, dok nije ovisna o NKG2D i njegovim ligandima MICA/B.

17. Decidualne CD56⁺ stanice NK ubijaju autologne decidualne CD14⁺ stanice stimulirane s lipopolisaharidom (100 ng/ml) ili MUC1 (200 µg/ml) statistički značajno većom učinkovitošću u omjerima od 6:1 do 50:1 i to od 10-50% u odnosu na nestimulirane CD14⁺ stanice kultivirane samo u mediju.

7. LITERATURA (referencije):

1. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Intern. Rev. Immunol.*, 2002, 21; 471-495.
2. Medawar, P. (1953). "Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates". *Symp. Soc. Exp. Biol. VII*: 320–338.
3. Mor G. *Immunology of pregnancy*, 2006. Springer Science.
4. Szekeres-Bartho J i sur.. Progesteron-mediated immunosuppression and the maintenance of pregnancy. *Res Immunol* 1990; 141:175.
5. Szekeres-Bartho J, Szabo J Kovacs L. Alteration of lymphocyte reactivity in pregnant women treated with the progesterone receptor inhibitor ZK 98734. *Am J Reprod Immunol* 1989; 21:48.
6. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010 June ; 63(6): 425–433.
7. Sacks GP, Sargent IL, Redman CWG. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 1999;20:114-118
8. King A, Hiby SE, Verma S, Burrows T, Gardner L, Loke YW. Uterine NK cells and trophoblast HLA class I molecules. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37(6):459-62.
9. Le Bouteiller P, Rodriguez AM, Mallet V, Girr M, Guillaudeux T, Lenfant F. Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol*. 1996;35:216-25.
10. McMaster MT, Librach CL, Zhou Y i sur. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol*. 1995;154:3771-8.
11. Loke YW, King A. *Immunology of implantation*. Baillieres Clinical Obstetrics and Gynecology 2000; 14:827-837.
12. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-274.

13. Hunt JS, Petroff MG, McIntire R, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy FASEB J. 2005; 19:681–693.
14. LeBouteiller P, Pizzato N, Barakonyi A, Solier C. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. J Reprod Immunol 2003; 59:219-234.
15. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM i sur. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. J Exp Med 2004; 8:957-965.
16. Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesteron receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. Endocrinology 1999; 140:4809-4820.
17. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens JA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. Am J Obstet Gynecol 2002; 187:1416-1423.
18. Hess AP i sur. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. Biol Reprod 2006.
19. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. Human reprod 1999; 14:1599-1605.
20. King A. Uterine leukocytes and decidualization. Hum reprod Update 2000; 6:28–36.
21. Aplin J. The biological basis of human implantation res Clin Obstet Gynaecol 2000; 14:757-764.
22. Simon C, Martin JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2000; 14:815-826.
23. Enders A. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Am J Anat 1967; 125:1-29.

24. Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 1973; 31:205-225.
25. Salamonse LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases-a review. *Placenta* 2003; 24(A):76-85.
26. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges: *Science* 2002; 296:2185-2188.
27. Thathiah A, Brayman M, Dharmaraj N, Julian JJ, Lagpw EL, Carson DD. Tumor necrosis factor alpha stimulates synthesis and ectodomain release in a human uterine epithelial cells. *Endocrinology* 2004; 145:119-4203.
28. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:48-59.
29. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction* 2006; 6(12):731-746.
30. Pijnenborg R. Implantation and immunology: maternal inflammatory and immune cellular responses to implantation and trophoblast invasion. *Reprod Biomed Online* 2002; 3:14-17 .
31. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007; 5:6.
32. Adams KA, Yan Z, Stevens AM, Nelson JL. The changing maternal „self“ hypothesis: a mechanism for maternal tolerance to fetus. *Placenta* 2007; 28:378-382.
33. Pijnenborg R, Vercruysse L, Verbist L, Van Asche FA. Relative contribution of interstitial and endovascular trophoblast to elastic breakdown in placental bed spiral arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:S43.
34. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; 69:1-7.

35. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson I, Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983;4:397–413.
36. Harris LK. Review: trophoblast-vascular cell interaction in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta* 2010; 1-6.
37. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine arteries in human pregnancy: facts and controversies *Placenta* 2006;27:939–58.
38. Moffet-King A. Natural killer cells and pregnancy *Nature Reviews Immunology*, 2002; 2:656-663.
39. Hanisch F, Muller S. The polymorphic appearance of human mucin. *Glycobiology* 2000; 10:439-449.
40. Burchell i sur. Development and characterisation of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res.* 1987; 47:5476-5482.
41. Mesequer M, Pellicer A, Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Molecular Human reproduction* 1998; 4(12):1089-1098.
42. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol.* 2006;16:467–476.
43. Brayman M, Thathiah A and Carson DD MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrin* 2004; 2:4–12.
44. Ligtenberg MJ, Vos HL, Gennissen AM, Hilkens J. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem* 1990; 265: 5573–5578.
45. Lagow E, DeSouza MM, Carson DD. Mammalian reproductive tract mucins. *Human Reproduction Updates* 1999; 5:280-292.
46. Pimental RA i sur. Synthesis and intracellular trafficking of MUC1 and mucins polarised mouse uterine cells. *J Biol Chem* 1996; 271:28128-28137.

47. Yamamoto M i sur. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma.associated antigen and β -catenin in cell adhesion. J Biol Chem 1997; 272:12492-12494.
48. Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. Mol Biol Cell. 1996 Apr;7(4):565–577.
49. Agrawal B, Krantz M, Reddish MA, Longenecker BM. Cancer associated MUC1 inhibits human T cell proliferation, which is reversible by IL-2. Nature Medicine 1998; 4:43-49.
50. Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. Epsialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. J Cell Biol 1995; 129:255–265.
51. Hilkens J, Ligtenberg MJL, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane associated mucins and their adhesion modulating properties. Trends Biochem Sci 1992;17:359-363.
52. Applin JD, MUC1 glycosilation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. Human Reproduction 1999; 14(2):17-25.
53. Surveyor, GA i sur. Expression and steroid hormonal control of Mucl in the mouse uterus. Endocrinology 1995; 136, 3639-3647.
54. Hey, N.A., Graham, R.A., Seif, M.W. and Aplin, J.D. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. J. Clin. Endocrinol. Metab.1994; 78, 337-342.
55. Mesequer M i sur. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. Biol reprod 2001; 64:590-601
56. Aplin JD, Davies JA. MUC1, glycans and cell surface barrier to implantation. Biochemical society Transactions 2001;29:153-156.

57. Thathiah A, Carson DD, MT1-MMO mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochem J* 2004; 382:363-373.
58. Laskarin G, Kammerer U, Rukavina D, Thomas AW, Fernandez N, Blois SM: Antigen presenting cells and materno fetal tolerance: An emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:255-267.
59. Kammerer U, Schoppet M, Mc Lellan AD, Kapp M: Human decidua contains potent immunostimulatory CD83+ dendritic cells. *Am J Pathol* 2000; 157:159-169.
60. Laskarin G i sur. The presence of functional mannose receptor on macrophages at the maternal fetal interface. *Human Reproduction* 2005; 20; 1057-1066.
61. Laskarin G, Redzović A, Rubeša Ž, Mantovani A, Allaven P, Haller H, Vlastelić I, Rukavina D. Decidual natural killer cell tuning by autologous dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59(5):433-445.
62. Allavena P, Chieppa M, Monti P, Pimonti L. From patern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev Immunol* 2004; 24(3):179-192.
63. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1572:364-386.
64. Osteen KG, Anderson TL, Schwartz K, Hargrove JT, Gorstein F. Distribution of tumor-associated glycoprotein-72 (TAG-72) expression throughout the normal femal reproductive tract. *Int J Gynecol Pathol.* 1992 Jul;11(3):216-20.
65. Laskarin G, Redzovic A, Vlastelić I, Haller H, Medančić SS, Solinas G, Rukavina D. Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) is a natural ligand for the C-type lectin-like domain that induces anti-inflammatory orientation of early pregnancy decidual CD1a+ dendritic cells. *J Reprod Immunol.* 2011; 88(1):12-23.

66. Chieppa M I sur. Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program. *The journal of Immunology* 2003; 171:4552–4560.
67. Chaouat G, The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007; 29(2):95-113.
68. Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin-15. *Biol Reprod* 2000; 62:959-968.
69. Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression at the human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 2000; 63:683-687.
70. Strbo N, Laskarin G, Bogovic Crncic T i sur. Short term cytolytic mediators expression in decidual lymphocytes is enhanced by interleukin-15. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55:217-225.
71. Laskarin G, Redzovic A, Vukelic P, Veljkovic D, Gulic T, Haller H, Rukavina D. Phenotype of NK cells and cytotoxic/apoptotic mediators expression in ectopic pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010 Nov; 64(5):347-58.
72. Laskarin G, Redzovic A, Medancic SS, Rukavina D. Regulation of NK-cell function by mucins via antigen-presenting cells. *Med Hypotheses*. 2010 Dec;75(6):541-3.
73. Shyu MK i sur. MUC1 expression is increased during human placental development and suppresses trophoblast-like cell invasion in vitro. *Biol. Reprod* 2008; 108:067629.
74. Horne AW, White JO, Margara RA, Williams R, Winston RM, Lalani E, MUC1: a genetic susceptibility to infertility. *Lancet* 2001; 28:1336-13367.
75. Bulmer JN, Morison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6:791-798.

76. Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in human decidua. *Biol Reprod* 2003; 69:1438-1446.
77. Tsuda H, Sakai M, Michimata T, Tanebe K, Hayakawa S, Saito S. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45:295-302.
78. Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in human decidua. *Clin Exp Immunol* 2004; 131:373-378.
79. Bulmer JN, Williams PA, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol.* 2010; 54:281-296.
80. Janeway CA, *Immunobiology* 2001; Garland Publishing.
81. Gordon S. The role of macrophages in immune regulation. *Res Immunol* 1998; 149:685-8.
82. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis, a question of balance. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:1419-1423 .
83. Stout RD, Suttles J: Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to change microenvironment. *J Leukoc Biol* 2004; 76(3):509-13.
84. Clarke RAF. Wound repair: overview and general consideration. In Clark RAF, editor. *The molecular cellular biology of wound repair*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1996: 3-50.
85. Mosser DM: The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73(2):209-212).
86. Duffield JS. The inflammatory macrophages: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 2003;104(1):27-38.
87. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defect of immune cell function in mice disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993;259:1739-1742.

88. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:23-35.
89. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13:453-61.
90. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophages polarisation in bacterial infection. *J. Immunol.* 2008;181:3733-3739.
91. Martinez FO, Helming LM, Gordon S. Alternative activation of macrophages: a immunological functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:451-83.
92. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 2008; 181:5829-35.
93. Nahrendorf M *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary function. *J Exp Med* 2007; 204:3037-3047.
94. Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:953-964.
95. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25:677-686.
96. Anderson CF, Gerber JS, Mosser DM. Modulating macrophage function with IgG immune complex. *J Endotoxin Res.* 2002; 8:477-481.
97. Ramalingam TR, Reiman RM, Wann TA. Exploiting worm and allergy models to understand Th2 cytokine biology. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:392-398.
98. Boissier D *et al.* Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- γ : a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 2002; 99:3427-3431.

99. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp. Med.* 1992; 176:287-292.
100. Puig-Kroger A i sur. Regulated expression of pathogen receptor dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes and macrophages. *J Biol Chem* 2004; 279:25680-25688.
101. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2000; 67:97-103.
102. van Ginderchart JA i sur. Classical and alternative activated macrophages: picking the best of both worlds for tumour promotion. *Immunobiology* 2006; 211:487-501 .
103. Ruckerl, D., Hessmann, M., Yoshimoto, T., Ehlers, S., Holscher, C. 2006. Alternatively activated macrophages express the IL-27 receptor alpha chain WSX-1. *Immunobiology* 211, 427–436.
104. Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infection. *Trends Parasitol* 2004; 20:126-133.
105. Torocsik D, Bardos H, Nagy L, Adany R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2132-2139.
106. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007; 117:1155-66.
107. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:975-87.

108. El Kasmi KC i sur. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol* 2008; 9:1399-406.
109. van den Heuvel i sur. Regulation of CD163 on human macrophages: cross linking of Cd163 induced signaling and activation. *J Leukoc Biol* 1999; 66:858-866.
110. Goerdt S, Bhardwaj R, Sorg C. Inducible expression of MS-1 high-molecular-weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cells/macrophages in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 1993; 142:1409-1422.
111. CaoY, Brombacher F, Tunyogi-Csapo M, Glant TT, Finnegan A. Interleukin-4 regulates proteoglycan-induced arthritis by specifically suppressing the innate immune response. *Arthritis Rheum* 2007; 56:861-870.
112. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS derived IL-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglia cells. *J Neurosci* 2007; 27:10714-10721.
113. Colton CA i sur. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse model of AD. *J Neuroinflammation* 2006; 3:27.
114. Schaer DJ i sur. CD163 is the macrophage scavenger receptor for naive and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* 2006; 107:373-380.
115. Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology* 2009; 214(7):630-641.
116. Croy BA i sur. Uterine natural killer cells:insight into their cellular and molecular biology from mouse modeling. *Reproduction* 2003;126:149-160.
117. Greenwood JD i sur. Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta* 2000;21:693-702.

118. Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reproductive immunology and Endocrinology* 2003; 1:8.
119. De M, Wood GW. Influence of Oestrogen and Progesteron on Macrophages Distribution in Mouse Uterus. *Journal of Endocrinology* 1990; 126:417-424.
120. Ben Hur H, Gurevich P, Berman V. The secretory immune system as part of the placental barrier in second trimester of pregnancy in humans. *In Vivo* 2001; 15:429-435.
121. Hunt JS, Robertson SA. Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J Reprod Immunol* 1996; 32:1-25.
122. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407:784-788.
123. Tonello A, Poli G. Tubal ectopic pregnancy: macrophages under the microscope. *Hum Reprod.* 2007; 22(10):2577-84.
124. Bulmer JN. Immunology of human reproduction. Kurpisz M, Fernandez N. Oxford: Bios Scientific Publishers 1995; 313-334 .
125. Hunt JS., Miller L, Platt JS. Hormonal regulation of uterine macrophages. *Dev Immunol* 1998;6:105-110.
126. Kauma SW, Aukerman SL, Eierman D, Turner T. Colony-stimulating factor-1 and c-fms expression in human endometrial tissues and placenta during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:746-751.
127. Daiter E, Pampers S, Yeung YG, Barad D, Stanley ER, Pollard JW. Expression of colony-stimulating factor-1 in the human uterus and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:850-858.
128. Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at the fetomaternal interface associated with pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2001; 52:35-43.

129. Aschcroft GS i sur. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* 2003;111:1309-1318.
130. Haines BP, Voyle RB, Rathien PD. Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs *Mol Biol Cell*. 2000 Apr;11(4):1369-83.
131. Schofield G, Kimber SJ. Leukocyte subpopulations in uteri of leukemia inhibitory factor knock out mice durin early pregnancy. *Biol reprod* 2005; 72:872-878.
132. TofarisGK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion on LIF and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulalted by IL-6 and LIF. *J Neurosci* 2002; 22:6696-6703.
133. Laabi Y, Metcalf D, Mifusud S, Di rango L. Differentiation commitment and regulator-specific granulocyte-macrophage maturation in a novel pro-B murine leukemia cell line. *Leukemia* 2000; 14:1785-1795.
134. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63:1-12.
135. Vince G.S, Starkey P.M., Sargent I.L. Redman C.W., Flow cytometric charctereristion of cell populations in human pregnancy decidua and isoltion of decidul macrophges. *J Immunol. Meth.*1990;132:181-189.
136. Reister F i sur. The distribution of macrophges in spiral arteries of the plcental bed in pre-eclmpsia differs from those in healthy patients. *Placenta*. 1999:229-233
137. Loke Y.W., King A. Human Implantation: Cell biology nd Immunology. Cambridge University Press 1995;127-129.

138. Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterisation of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunology* 2003;131:498-505.
139. Cupurdija K i sur. Macrophages of human first trimester decidua express markers associated to alternative activation. *Am J Reproductive Immunology* 2004;51:117-122.
140. Martinez-Pomares L, Gordon S. Potential role of the mannose receptor in antigen transport. *Immunol Lett* 1999; 65:9-13.
141. Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J Biol Chem* 1990; 265:12156-12162.
142. Kawabata S. Tachylectins: a family of defense molecules in invertebrate innate immunity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:414-421.
143. Fest S, Aldo PB, Abrahams VM. Trophoblast-macrophage interaction: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007;57:55-66.
144. Kyaw Y, Hasegawa G, Takatsuka H, Shimada-Hiratsuk M, Umezu H, Arakawa M, Naito M. Expression of macrophage colony-stimulating factor, scavenger receptors and macrophage proliferation in the pregnant mouse uterus. *Arch Histol Cytol* 1998; 61:383-393.
145. Arcuri F, Ricci C, Ietta F, Cintorino M, Tripodi SA, Cetin I, Garzia E, Schatz F, Klemi P, Santopietro R, Peulesu L. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localisation during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol reprod* 2001; 64:1200-1205.
146. Arcuri F, Cintorino M, Vatti R, Carducci A, Liberatori S, Paulesu L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first trimester human trophoblast. *Biol reprod* 1999; 60:1299-1303.

147. Menetrier-Caux i sur. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34+ progenitors by tumor cells: role of IL-6 MCSF. *Blood* 1998; 88:4778-4791.
148. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:11-12.
149. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RE. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod* 1996; 54:183-196 .
150. Yoon MS, Lee JS,,: A pigenin inhibits immunostimultory function of dendritic cells: implication of immunotherapeutic adjuvant. *Mol Pharmacol* 2006; 70:1033-1044.
151. Petroff M.G., Sedlmayr P, Azzola D, Hunt J.S.Decidual macrophages are potentially suseptible to inhibition by class Ia and class Ib HLA molecules. *J Reprod Immunol* 2002;56:3-17.
152. Matsumoto Y, Wang LL, Yokoyama WM, Aso T. Uterine macrophages express the gp49B inhibitory receptor in midgistetion. *J Immunol* 2001; 166:781-786
153. Spielman J, Lee RK, Podack ER: Perforin/Fas-ligand double deficiency is associated with macrophage expansion and severe pancreatitis. *J Immunol* 1998; 161:7063-7070.
154. Pongcharoen S, Bulmer JN, Searle RF. No evidence for apoptosis of decidual leukocytes in normal and molar pregnancy: implications for immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2004; 138:330-336.
155. Saito S, Sakai M, Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003;59:161-173.
156. Robertson SA i sur. Immune modulators of implantation and placental development-a work shop report. *Placenta* 2003;24:216-220.

157. McCracken SA, Drury CL, Lee HS, Morris JM. Pregnancy is associated with suppression of nuclear factor kappa B/IkappaB activation pathway in peripheral blood mononuclear cells. *J Reprod Immunol* 2003;58:27-47.
158. Szekeres-Bartho J, Par G, Szereda L, Smart CY, Achatz I. Progesteron and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:176-182.
159. Carr BR i sur. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:416-422.
160. Hardy DB, Janowski BA, Corey DR, Mendelson CR. Progesterone receptor plays a major antiinflammatory role in human myometrial cells by antagonism of nuclear factor-kappaB activation of cyclooxygenase 2 expresion. *Mol Endocrinol* 2006;20:2724-2733.
161. Ramirez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D, Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4+ cells in vitro. *J Immunol* 1996; 156:2406-2412.
162. Renaud SJ, Graham CH. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Imunol Investig* 2008; 37:535-564.
163. He Y.Y, Du M.R., Guo P.F. Regulation of C-C motif chemokine ligand 2 and its receptor in receptor in human decidual stromal cells by pregnancy associated hormones in early gestation. *Hum Reprod* 2007;22:2733-2742.
164. Miller L, Hunt J.S. Seks steroide hormones and macrophage function. *Life Sci.* 1996;59:1-14.
165. Hunt JS., Miller L, Platt JS. Hormonal regulation of uterine macrophages. *Dev Immunol* 1998;6:105-110.
166. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumor associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumor

- progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42:717-727.
167. Bürk MR, Troeger C, Brinkhaus R, Holzgreve W, Hahn S. Severely reduced presence of tissue macrophages in the basal plate of pre-eclamptic placentae. *Placenta*. 2001; 22(4):309-16.
 168. Kim JS, Romero R, Cushenberry E, Kim YM, Erez O, Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kim CJ. Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. *Placenta*. 2007; 28(5-6):571-6.
 169. Lockwood CJ, Matta P, Krikun G, Koopman LA, Masch R, Toti P, Arcuri F, Huang ST, Funai EF, Schatz F. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in first trimester human decidual cells: implications for preeclampsia. *Am J Pathol*. 2006;168(2):445-52.
 170. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol*. 2010; 54(2-3):281-94.
 171. Quenby S i sur. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14:2386-2391.
 172. Giardi G, Yarilin D, Thruman J, Holers M, Salamon VM. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and graft restriction. *J Exp Med* 2006; 203:2165-2175.
 173. Zeek PM, Assali NS. Vascular changes in the decidua associated with eclamptogenic toxicity of pregnancy. *Am J Clin Pathol* 1950; 20:1099-1109.
 174. Brown MA. Pregnancy-induced hypertension: pathogenesis and management. *Aust N Z J Med* 1991; 21:257-273.
 175. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11:342-352.

176. Renaud SJ, Postovit L, MacDonald-Goodfellow SK, McDonald GT, Caldwell JD, Graham CH. Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness in vitro. *Biol Reprod* 2005; 73:237-243.
177. S. Saito S, Umekage H, Sakamoto J, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased T-helper type-1 immunity and decrease T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:297-306.
178. Wilczinsky JR, Tchzorezwsky H, Glowacka E i sur. Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and preeclampsia: *Mediators Inflamm* 2002; 11:105-111.
179. Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B. Macrophages induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001; 81:1143-1152.
180. Meisser A, Chardonnens D, Campana A, Bishopf P. Effects of tumour necrosis factor-alfa, interleukin-1-alfa, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:252-260.
181. Pathak N, Sawhney H, Vasishta K, Majumadar S. Estimation of oxidative production of nitric oxide (nitrates, nitrites) in preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynecol* 1999; 39:484-487.
182. Postovit LM, Adams MA, Graham CH. Does nitric oxide play a role in the aetiology of preeclampsia? *Placenta* 2001; 22:51-55.
183. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2 and 3 is associated with decrease in active proteases *Biol Reprod* 2005; 73:374-381.
184. Yui J, Garcia-lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994;15: 819-835.

185. Balkundi DR, Ziegler JA, Watchko JF, Craven C, Trucco M. Regulation of Fas/FasL in human trophoblasts: possible implications for chorioamnionitis. *Bio Reprod* 2003; 69:718-724.
186. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G. C-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:33-41.
187. Colucci F i sur. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003; 3:413-425.
188. Trinchieri G. Biology of nature killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47:187-376.
189. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Curr opin Immunol* 2003; 15:45-51.
190. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2:293-299.
191. Karre K, MHC class I molecules and the missing self. *Scan J Immunol* 2002; 44:221-228.
192. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Natural killer cells: a mystery no more. *Scan J Immunol* 2002; 55:229-232.
193. Wu P, Wei J, Zhang C, Zhang J, Tian Z. Regulation of NK cell activation by stimulatory and inhibitory receptors in tumor escape from innate immunity. *Front Biosci* 2005; 10:3132-3142.
194. Cooper MA i sur. The biology of human natural killer cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-640.
195. Cooper MA i sur. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role from the CD56bright subset. *Blood* 2001; 97:3146-3151.
196. Fehniger TA i sur. CD56 bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cells by T cell derived IL-2: a potential nes link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; 101:3052-3057.

197. Hanna J i sur. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* 2003; 102:1569-1577.
198. Hanna J, Mandelboim O. When killers become helpers. *Trends Immunol* 2007; 28:201-206.
199. Hanna J i sur. Novel insight on human NK cells immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J Immunol* 2004; 173: 6547-6563.
200. Frey C i sur. Differential expression and function of L selectin on CD56 bright and CD56 dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998; 161:400-408.
201. Sentman CL, Meadows SK, Wira CR, Eriksson M, Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J Immunol* 2004; 173:6760-6766.
202. Kitaya K, Nakayama T, Daikoku N, Fushili S, Honjo H. Spatial and temporal expression of ligands for CXCR3 and CXCR4 in human endometrium *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2470-2476.
203. Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern N, Kopcow LA. Strominger JL, TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16-NK with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 3378-3383.
204. Kalkunte S, Chichester CO, Gotsck F, Sental CL, Romero R. Evolution of Non-Cytotoxic uterine natural killer cells. *AJRI* 2008; 59:425-432.
205. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta* 2008; 22:60-66.
206. Gubbay O, Critchley HO, Bowen JM, King A, Jabbour HN. Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56+ natural killer cells of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2329-2335.

207. Henderson TA, Saunders PT, Mofet King A, Groome NP, Critchley HO. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:440-449.
208. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 2005; 26:44-62.
209. Ain R, Dai G, Dunmore JH, Godwin AR, Soares MJ. A prolactin family paralog regulates reproductive adaptations to a physiological stressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:16543-16548.
210. Laskarin G i sur. Progesteron inducing blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocytes cytotoxicity. *Am J Preprod Immunol* 2002; 48:201-209.
211. Hiby SE, King A, Sharkey AM, Loke YW. Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR. *Mol Immunol* 1997; 34:419-30.
212. Rabot M i sur. HLA ClassI/NK cell receptor interaction in early human decidua basalis: possible function consequences. In: Markert U editor: *Immunology of Pregnancy* vol 89 Basel Karger; 2005 72-83.
213. Barakonyi A i sur. Cutting edge: engagement of CD160 by its LA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol* 2004; 173:5349-54.
214. Tabiasco I i sur. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties-a review. *Placenta* 2006; 27: 34-39 .
215. Wu X, Li DJ, Yuan MM, Zhu Y, Wang MY. The expression of CXCR4/CXCL12 in the first trimester human trophoblast cells. *Biol Reprod* 2004; 70:1877-85.

216. Hanna J, Salamonsen LS, Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2007; 19:266–272.
217. Li X i sur. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1823-34.
218. Jokhi PP, King A, Jubinsky YW. Demonstration of the low affinity alpha subunit of granulocyte-macrophage colony stimulating receptor (GM-CSF R alpha) on human trophoblast and uterine cells. *J reprod Immunol* 1994; 26:147-64.
219. Hanna J i sur. Proteomic analysis of human natural killer cells: insights on nes potential NK immune function. *Mol Immunol* 2005; 42:425-31.
220. Mocikat R i sur. Natural killer cells activated by MHC class I (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003; 19:561-9.
221. Cooper MA i sur. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset. *Blood* 2001; 97:3146-51.
222. Schust DJ, Tortorella D, Ploegh HL. HLA-G and HLA-C at the feto-maternal interface: lessons learned from pathogenic viruses. *Semun Cancer Biol* 1999; 9:37-46.
223. Loke YW, King A. Immunology of implantation. *Baillieres Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2000; 5:827-837l.
224. Long EO, Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual Reviews of Immunology* 1999; 391:795-799.
225. Braud VM i sur. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391:795-799.
226. Lanier LL. NK cell receptors. *Annual Rev Immunology* 1998; 16 359-393.

227. Zhang C, Zhang J, Wei H, Tian Z, Imbalance of NKG2D and its inhibitory counterparts: how does tumor escape from innate immunity? *Int Immunopharmacol* 2005; 5:1099-1111 .
228. Vacca P, Cantoni C, Prato C, Fulcheri E, Moretta A, Moretta I, Mingari MC. Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int Immunol*. 2008 Nov; 20(11):1395-405.
229. Sivori S i sur. Triggering receptors involved in natural killer cell mediated cytotoxicity against choriocarcinoma cell lines. *Hum Immunol* 2000; 61:1055-8.
230. Vacca P i sur. Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK cell function. *Blood* 2006; 13:4078-4085.
231. Kopcow HD i sur. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:15563.
232. Hanna J i sur. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12:1065-74.
233. Bogovic Crncic T i sur. Perforin and Fas/FasL cytolytic pathways at the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54:241-248.
234. Jerzak M, Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal–foetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 100:138-142.
235. Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, FasL and tumor necrosis factor are major cytotoxic molecules used by lymphokine activated killer cells. *J Immunol* 1996; 157:1919-1925.

236. Phillips TA, Hunt JS. Death-Inducing Tumour Necrosis Factor (TNF) Superfamily Ligands and Receptors are transcribed in Human Placentae, Cytotrophoblasts, Placental Macrophages and Placental Cell Lines. *Placenta* 2001; 22:663–672.
237. Podack ER, Cohn ZA, Young JS. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) form cytotoxic T cells: structural, immunological and functional similarities. *Science* 1986; 233:184-190.
238. Lieberman J. Cell death and immunity: the ABCs of granule mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:361–370.
239. Trambas CM, Griffiths GM. Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* 2003; 4(5):399-403
240. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(10):735-47.
241. Motyka B i sur. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell.* 2000; 103(3):491-500.
242. Rukavina D, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER. Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:394-404 .
243. King A, Birkby C, Loke YW. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cell Immunol* 1998, 118:337-344.
244. King A, Loke YW. Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2 stimulated decidual NK cells. *Cell Immunol* 1990; 129:435-448.
245. Rukavina D, Podack ER. Abundant perforin expression at the maternal fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant. *Immunol Today* 2000; 21:160-163

246. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv. Immunol.* 1994;57:129–44.
247. Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today* 1997; 18:240–4.
248. Hunt JS, Vassomer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* 1997; 158:4122–4128.
249. Strand S, Galler PR. Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. *Mol Med Today* 1998; 4:63–68.
250. Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10:26–35 .
251. Nagata S. Fas Ligand induced apoptosis. *Annual reviews of Genetics* 1999; 33:29–55.
252. Hammer A, Blaschitz A, Daxböck C, Walcher W, Dohr G. Fas and Fas-ligand are expressed in the uteroplacental unit of first trimester pregnancy. *Am. J. Reprod Immunol.* 1999;41:41–51.
253. Hammer A, Dohr G. Apoptotic nuclei within the uterine decidua of first trimester pregnancy arise from CD45 positive leukocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1999; 42:88–94.
254. Joswig A, Gabriel HD, Kibschull M, Winterhager E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:44.
255. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab. Invest.* 1999;79:1687–702.

256. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mo Hum Reprod* 2004; 10:55-63 .
257. Payne SG, Smith SC, Davidge ST, Baker PN, Guilbert LJ. Death receptor Fas/Apo-1/CD95 expressed by human placental cytotrophoblast does not mediate apoptosis. *Biol Reprod* 1999; 60:1144-1150.
258. Aschenkazi S i sur. Differential regulation and function of the Fas/FasL system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002; 66:1853-1861 .
259. Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, Ichijo M. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua *Int Immunol*. 1993;5(5):559-63.
260. von Rango U, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, Beier HM. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. *Placenta* 2003; 24:929-40.
261. Hayakawa S, Nagai N, Kanaeda T, Karasaki-Suzuki M, Ishii M, Chishima F, Satoh K. Interleukin-12 augments cytolytic activity of peripheral and decidual lymphocytes against choriocarcinoma cell lines and primary culture human placental trophoblasts. *Am J Reprod Immunol*. 1999; 41(5):320-9.
262. Nguyen QH, Robertson RL, Ank BJ, Lin SJ, Thomas EK, Stiehler ER. Interleukin-15 enhances antibody dependent cellular cytotoxicity and natural killer activity in neonatal cells. *Cell Immunol* 1998.
263. Faust ZS, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Bartho J. Progesterone-inducing blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Al J Reprod Immunol* 1999; 42:71-75.
264. Hyodo Y i sur. IL-18 up regulates perforin mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol* 1999; 162:1662-1668.

265. Stallmach T, Ehrenstein T, Isenmann S, Muller C, Hengartner H, Kagi D. The role of perforin expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur J Immunol* 1995; 25:3342-3348.
266. Spielmann J, Lee RK, Podack ER. Perforin/Fas-ligand double deficiency is associated with macrophage expansion and severe pancreatitis. *J Immunol* 1998; 161:7063-7070.
267. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002; 66:1133-1150.
268. Peter ME, Taming TRAIL: the winding path to a novel form of cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2005; 12(7):693-4.
269. Reed J.C, Caspases and cytokines: roles in inflammation and autoimmunity. *Adv Immunol* 1999;73:265–99.
270. Martinez-Lorenzo MJ, Gamen S, Etxeberria J, Lasier P, Larrad L, Piñeiro A, Anel A, Naval J, Alava MA. Resistance to apoptosis correlates with a highly proliferative phenotype and loss of Fas and CPP32 (caspase-3) expression in human leukemia cells. *Int J Cancer.* 1998; 75(3):473-81.
271. Phillips T.A i sur. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J. Immunol.* 1999; 162:6053–9.
272. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(6):613-30.
273. Dominguez F, Pellicer A, Simon C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface--a review. *Placenta.* 2003; 24:48-55.
274. Zhang J, Lathbury LJ, Salamonsen LA. Expression of the chemokine eotaxin and its receptor, CCR3, in human endometrium. *Biol Reprod.* 2000; 62(2):404-11.

275. Hampton AL, Rogers PA, Affandi B, Salamonsen LA. Expression of the chemokines, monocyte chemotactic protein (MCP)-1 and MCP-2 in endometrium of normal women and Norplant users, does not support a central role in macrophage infiltration into endometrium. *J Reprod Immunol.* 2001 Feb;49(2):115-32.
276. Jones RL, Hannan NJ, Kaituu TJ, Zhang J, Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the time of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6155-6167.
277. Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou CL, Zhou Y, Huang L, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *J Exp Med.* 2001; 193(10):1199-212.
278. Red-Horse K, Drake PM, Gunn MD, Fisher SJ. Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2199-213.
279. Hannan NJ, Salamonsen LA Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19(3):266-72.
280. Drake PM, Red-Horse K, Fisher SJ. Reciprocal chemokine receptor and ligand expression in the human placenta: implications for cytotrophoblast differentiation. *Dev Dyn.* 2004; 229(4):877-85.
281. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1995; 155(8):3877-88.
282. Robertson MJ, Williams BT, Christopherson K 2nd, Brahmi Z, Hromas R. Regulation of human natural killer cell migration and proliferation by the exodus subfamily of CC chemokines. *Cell Immunol.* 2000; 199(1):8-14.

283. Yamashita U, Kuroda E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol.* 2002; 22(2):105-14.
284. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. "Macrophage inflammatory protein-1". *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 13 (6): 455–81.
285. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of the natural killer cells. *Journal of leukocyte Biology* 2002; 71:173-183.
286. Akiyama M, Okabe H, Takakura K, Fujiyama Y, Noda Y. Expression of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999; 106(7):725-30.
287. Tsuda H, Michimata T, Hayakawa S, Tanebe K, Sakai M, Fujimura M, Matsushima K, Saito S. A Th2 chemokine, TARC, produced by trophoblasts and endometrial gland cells, regulates the infiltration of CCR4+ T lymphocytes into human decidua at early pregnancy. *AJRI* 2002; 48(1):1-8.
288. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10:295–331.
289. Kishimoto T, Tago T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76:253–262.
290. Mosmann T.R, Sad S. The expanding universe of T cell subsets - Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 1996; 17:138–146.
291. Piccinni M.P, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature Med.* 1998; 4:1020–1024.
292. Saito S i sur. Functional expression on human trophoblasts of interleukin 4 and interleukin 7 receptor complexes with common g chain. *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 1997; 231:429–434.

293. Akbar A.N, Salmon M, Janossy G. The synergy between native and memory T cells during activation. *Immunol. Today* 1991; 12:184–188.
294. Saito S, Nishikawa K, Morii T, Narita N, Enomoto M, Ito A, Ichijo M. A study of CD45RO, CD45RA and CD29 antigen expression on human decidual T cells in an early stage of pregnancy. *Immunol. Lett.* 1994; 40:193–197.
295. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Littpn MJ, Fisher S.J. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J. Exp.Med.* 1996; 184: 539–548.
296. Saito S, Fukunaga R, Ichijo M, Nagata S. Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor at the fetomaternal interface in murine and human pregnancy. *Growth Factors* 1994;10:135–143.
297. Pan L, Delmonte J, Jolonen CK, Ferrara LM. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995; 86:4422–4429.
298. Piccinni MP, Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res.* 1996; 15(2):141-50.
299. Fehniger T.A. and Caligiuri M.A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97:14–32.
300. Saito i sur. The effect of interleukin-2 and transforming growth factor 2 (TGF-2) on the proliferation and natural killer activity on decidual CD16-CD56+ natural killer cells. *Cell Immunol.* 1993; 152:605-613.
301. Lyons AB. Analysing cell division and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 2000; 243(1-2):147-154.

302. Kammerer U i sur. Unique apperance of proliferating antigen presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. Am J Pathol 2003; 162:887-896.
303. Soileux E i sur. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro Journal of Leukocyte Biology 2002; 71, 445:457.
304. Mizumoto N, Takashima A. Cd1a and Langerin, acting more than Langerhans cells marker, J. Clin. Invest. 113:658–660 (2004).Hum Immunol. 2000; 61(3):193-201
305. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. J Immunol 1995; 154:3821–3835
306. Weiping C, Szu Hee L, Jinhua L. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells Biochem. J. 2005; 385, 85–93.
307. Gustafsson C i sur. Gene expression profiling of human decidual macrophages: Evidence for immunosuppressive phenotype. PLOS 2008; 3(4):e2078
308. Engert S, Rieger L, Kapp M, Becker JC, Dietl J, Kämmerer U. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. Am J Reprod Immunol. 2007; 58(2):129-37.
309. Cabalero-Campo P i sur. Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation. Mol Hum Reprod. 2002; 8(4):375-384.
310. Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. Cell Signal. 2004 Nov;16(11):1201-10.

311. Balistreri CR, Caruso C, Grimaldi MP, Listi F, Vasto S, Orlando V, Campagna AM, Lio D, Candore G. CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1100:162-72.
312. Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, Okamoto H, Yamazaki H, Ohta K, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S, Yachie A. Selective expansion of CD16^{high}CCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005; 142(3):461-70.
313. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(3):584-92.
314. Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S. CD14⁺CD16⁺monocytes subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:566–70.
315. Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreessen R, Fingerle-Rowson G. Cytokine production precedes the expression of CD14⁺CD16⁺ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 1997; 8:73–5.
316. Kawanaka N *et al.* CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2578–86.
317. Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeflner- Cavaillon N. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 1995; 25:3418–24.
318. Strauss-Ayali D, Conrad MS, Mosser 1 MD Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82:244–252.

319. Madsen M, Graversen JH, Moestrup SK. Haptoglobin and CD163: captor and receptor gating hemoglobin to macrophage lysosomes. *Redox Rep.* 2001; 6(6):386-8.
320. Moestrup SK, Moller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 2004;36(5):347-54.
321. Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck JH, Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy *Mol Immunol.* 2010; 47(7-8):1650-60.
322. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009; 113(4):887-92.
323. Hintz KA i sur. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol.* 2002; 72(4):711-7
324. Hooger P, Sorg C, Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 288(4):841-3.
325. Philippidis i sur. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.* 2004;9 4(1):119-26.
326. Kerrigan AM, Brown GD.C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology.* 2009; 214(7):562-75.
327. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment:

- downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995, 182: 389-400.
328. Sung SS, Nelson RS, Silverstein SC. The role of the mannose/N-acetylglucosamine receptor in the pinocytosis of horseradish peroxidase by mouse peritoneal macrophages. *J Cell Physiol.* 1983; 116(1):21-5
329. Allavena P, Chieppa M, Bianchi G, Solinas G, Fabbri M, Laskarin G, Mantovani A, Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clin Dev Immunol.* 2010; 2010:547179.
330. Švajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity *Cellular Signalling* 22 (2010) 1397–1405.
331. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Köthe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, Goerdts SM ϕ 1 and ϕ 2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology.* 2006; 211(6-8):473-86.
332. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2010; 17(3):209-18.
333. Porta C *in situ*. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor- β . *PNAS* 2009; 106(35):1478-14893.
334. King A, Jokhi PP, Smith SK, Sharkey AM, Loke YW. Screening for cytokine mRNA in human villous and extravillous trophoblast using the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Cytokine* 1995; 7:364-371.
335. von Rango U. Fetal tolerance in human pregnancy-a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. *Immunol Letters* 2008; 115:21-32.

336. Liu Z, Chen Y, Yang Y, Peng JP. The effect on MHC class II expression and apoptosis in placenta by IFN γ administration. *Contraception* 2002; 65:177-84.
337. King A i sur. Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 2000; 21:376-378.
338. van der Meer A i sur. Membrane bound HLA-G activates proliferation and interferon gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:189-195.
339. Rieger L i sur. Th1 and Th2 like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influences by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:255-261.
340. Wood KJ, Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol* 2006; 27:183-187.
341. Lindstrom C, Matthiesen L, Berg G, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine Secretion Patterns of NK Cells and Macrophages in Early Human Pregnancy Decidua and Blood: Implications for Suppressor Macrophages in Decidua. *AJRI* 2003; 50:444-452.
342. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 2002; 168(7):3195-204.
343. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo *J Exp Med.* 1995; 182(1):155-62.
344. Carson DD, DeSouza MM, Kardon R, Zhou X, Lagow E, Julian J. Mucin expression and function in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 1998; 4(5):459-64.

345. DeSouza MM, Surveyor GA, Price RE, Julian J, Kardon R, Zhou X, Gendler S, Hilkens J, Carson DD. MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol*. 1999; 45(2):127-58.
346. Lancaster CA, Peat N, Duhig T, Wilson D, Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 173(3):1019-29.
347. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, White JO. The effects of sex steroid hormones and interleukin-1-beta on MUC1 expression in endometrial epithelial cell lines. *Reproduction*. 2006; 131(4):733-42.
348. Simón C, Valbuena D. Embryonic implantation. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1999; 60(2):134-6.
349. Giuntoli RL 2nd, Rodriguez GC, Whitaker RS, Dodge R, Voynow JA. Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Res*. 1998; 58(23):5546-50.
350. Shurety W, Stewart NL, Stow JL. Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide. *Mol Biol Cell*. 1998; 9(4):957-75.
351. Lamaze C, Schmid SL. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1995; 7(4):573-80.
352. Herrmann-Lavoie C, C. V. Rao, Akoum A,.Chorionic Gonadotropin Down-Regulates the Expression of the Decoy Inhibitory Interleukin 1 Receptor Type II in Human Endometrial Epithelial Cells. *Endocrinology* 2007; 148(11):5377–5384 .
353. Krussel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simon C. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110(1):2–9.
354. Mantovani A, Muzio M, Ghezzi P, Colotta C, Introna. Regulation of inhibitory pathways of the interleukin-1 system. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 840:338-51.

355. Simón C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A. The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol.* 1997; 37(1):64-72.
356. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)₁ and T(H)₃ regulatory cells. *Nat Immunol* 2001; 2:671-2.
357. Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infect Immun.* 1997; 65(3):1077-82.
358. Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42:145-151.
359. Giri JG, Anderson DM, Kumaki S, Park LS, Grabstein KH, Cosman D. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukocyte Biol* 1995; 57:763–766.
360. Mingari MC, Ponte M, Betone S, Schiavetti F, Vitale C, Bellomo R, Moretta A, Moretta L. HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/ NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8₁ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 95:1172–1177.
361. Verma S, King A, Loke YW. Expression of killer-cell inhibitory receptors (KIR) on human uterine NK cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 979–983
362. Sotosek V, Laskarin G, Strbo N, Dohr G, Blaschitz A, Podack ER, Rukavina D. Decidual macrophages are the population of decidual adherent cells which regulates perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol.* 1999; 42(2):76-82.
363. Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, Fenoglio D, Ragni N, Moretta L, Mingari MC, Crosstalk between decidual NK and CD14+

myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(26):11918-23.

364. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. J Reprod Immunol 2009; 82:24-31.

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Suzana Sršen Medančić, dr.med.

Barutanski breg 21, Zagreb

Mob: 091.510.48.92

e-mail: srsens@hotmail.com

DATUM I MJESTO ROĐENJA

15. rujna 1978., Karlsruhe, Njemačka

ZAPOSLENJE

Klinika za kirurgiju, Zavod za dječju kirurgiju, KBC Zagreb

ŠKOLOVANJE

1985. - 1993. Osnovna škola u Opuzenu

1993. - 1997. Jezična gimnazija u Metkoviću

1997. - 2003. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

2003. - 2004. Pripravnički staž , KBC Rijeka

2004. Poslijediplomski znanstveni studij "Biomedicina" na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci

2005. Državni ispit, Zagreb

2006. -2010. Specijalizant dječje kirurgije, KBC Zagreb

AKADEMSKI STUPNJEVI

18. srpnja 2003. Doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilište u Rijeci

ZNANSTVENI STUPNJEVI

Od 2. siječnja 2004. do 1.travnja 2006. znanstveni novak na Zavodu za fiziologiju i
imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Znanstvene nagrade i priznanja

1. Stipendist Općine Slivno Ravno (Opuzen) od akad. god. 1997./98. do
2002/2003.

2. Priznanje za postere prezentirane na Godišnjem sastanku Hrvatskog imunološkog društva, 8.-10. listopada 2004., Opatija:

- A. Sršen S, Laškarin G, Čupurdija K, Štrbo N, Dupor J, Bogović Crnčić T, Gašparović M, Veljković D, Randić LJ and Rukavina D, Tumor associated glycoprotein-72 (TAG-72) binds to mannose receptor on decidual macrophages and enables them to induce interleukin-4 production in naive T cells, 2004 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Opatija, Croatia, October 8-10, 2004.
- B. Juretić K, Štrbo N, Bogović Crnčić T, Dorčić D, Dupor J, Čupurdija K, Sršen S, Laškarin G, Randić LJ, Rukavina D. Lineage, maturity and phenotype of dendritic cells at human and murine maternal-fetal interface, 2004 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Opatija, Croatia, October 8-10, 2004.

Članstva

1. Od 1997.-2003. član sveučilišnog kluba "4" plus
2. Od 2004. član Hrvatskog imunološkog društva
3. Od 2005. član Hrvatske liječničke komore
4. 4. - 10. lipnja 2005., Malinska - Član Lokalnog organizacijskog odbora 1. EMBIC Ljetne škole
5. Od 2006. član Hrvatskog društva za dječju kirurgiju
6. Od 2006. član Hrvatskog kirurškog društva
7. Od 2010. član Hrvatskog liječničkog zbora.

ZNANSTVENA DJELATNOST

Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

"Th1 citokini i citolitički mehanizmi u trudnoći" (br. 0062029) glavnog istraživača Akademika Daniela Rukavine. Projekt financira Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske, 2002

"EMBIC - The Control of Embryo Implantation": Studies of gene expression, protein profiles/functions at the uterus embryonic level: cellular and molecular developmental events at the feto/maternal interface - Network of Excellence, Contract number: 512040, LSHM-CT-2004-512040, 1. listopada 2004.

"Imunoregulacijske funkcije antigen predočnih stanica tijekom rane trudnoće" (br. 062-0620402-0377) glavnog istraživača Prof. dr.sc. Gordane Laškarin. Projekt financira Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske

PUBLIKACIJE

POGLAVLJA U KNJIZI

1. Sršen Medančić, Suzana; Juretić Franković, Koraljka; Veljković, Danijela; Laškarin, Gordana; Dupor, Jana; Rukavina, Daniel. Cytolytic and apoptotic signalling pathways at the maternal-fetal interface. Embryo implantation: from basics to clinics. Rukavina, Daniel ; Chaouat, Gerard (ur.) Rijeka : Sveučilište u Rijeci, 2006. Str. 119-131.

ZNANSTVENI RADOVI U CURRENT CONTENTS (CC) ČASOPISIMA

1. Bogovic Crncic T, Laskarin G, Juretic K, Strbo N, Dupor J, Srsen S, Randic Lj, Le Bouteiller Ph, Tabiasco J, Rukavina D. Perforin and Fas/FasL Cytolytic Pathways at the Maternal-Fetal Interface. Am J Reprod Immunol 2005;54:241-248.
2. Laskarin G, Redzovic A, Srsen Medancic S, Rukavina D. Regulation of NK-cell function by mucins via antigen-presenting cells. Med Hypotheses. 2010 Aug 9.
3. Laskarin G, Redzovic A, Vlastelic I, Haller H, Medancic SS, Solinas G, Rukavina D. Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) is a natural ligand for the C-type lectin-like domain that induces anti-inflammatory orientation of early

pregnancy decidual CD1a+ dendritic cells. J Reprod Immunol. 2011

Jan;88(1):12-23

**ZNANSTVENI RADOVI OBJAVLJENU U ČASOPISIMA INDEKSIRANIM
U INDEX MEDICUS-u**

1. Bogović M, Fiolić Z, Čavar S, Luetić T, Antabak A, Sršen Medančić S, Batinica S. Liver Tumors in childhood. Libri Oncol.2008;36: 37-39

Kongresna priopćena objavljena u CC časopisu

1. Sršen S, Laškarin G, Dupor J, Juretić K, Sotošek-Tokmadžić V, Haller H, Rupčić S, Randić, Lj, Rukavina D. Tubal mucosa implantation site is characterized by infiltration of CD3+CD8 bright+T cells and relativ lack of NK cells. European congress of reproductive immunology, Pilsen , American jurnal of reproductive immunology 2004, Vol.51
2. Strbo N, Juretic K, Cupurdija K, Dupor J, Bogovic Crncic T, Dorcic D, Srsen S, Laskarin G, Randic Lj, Podack ER, Rukavina D. Heat shock protein gp96: immune modulation at the materno-fetal interface, IX International Congress of Reproductive Immunology - Reproductive Immunology into a New Era, October 11-15, 2004, Hakone, Japan, Am J Reprod Immunol, 52(suppl.1):40, 2004.
3. G. Laskarin, S. Srsen, K. Cupurdija, N. Strbo, K. Juretic, J. Dupor, M. Gasparovic, D. Veljkovic, A. Mantovani, Lj. Randic, D. Rukavina. Immunologic role of tumor associated glycoprotein-72. 25th anniversary meeting of American Society for Reproductive Immunology, Providence, Rhode Island, June 16-18, 2005, Am J Reprod Immunol 2005; 53:293.

4. Juretić Franković, Koraljka; Laškarin, Gordana; Strbo, Nataša; Bogović Crnčić, Tatjana; Dupor, Jana; Dorčić, Dorotea; Sršen Medančić, Suzana; Veljković, Danijela; Randić, Ljiljana; Tabiasco, Julie; Le Bouteiller; Philippe; Rukavina, Daniel. Cytotoxic activity of human decidual natural killer cells against k562 cell line and its hla-g transfectant; 4th European Congress of Reproductive Immunology, Graz, Austria, July, 05-09. 2006. Am. J. Reprod. Immunol. 2006, Vol. 56, p46-46, 2006.
5. Laskarin, Gordana; Srsen Medancic, Suzana; Redzovic, Arnela; Vukelic, Petar; Gulić, Tamra; Vlastelic, Ivan; Haller, Herman; Rukavina, Daniel. Mucine 1 hampers the proliferation and the cytolytic mediators' expression in NK cells sustained by CD14+ antigen presenting cells at the maternal-fetal interface. Journal of reproductive Immunology. Robertson, Sarah; Ware Branch, D; Saito Shigeru(ur.) Nizozemska: Elsevier, 2009.142-142 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
6. Laskarin G, Srsen Medancic S, Dupor J, Veljkovic D, Juretic Frankovic K, Randic LJ, Stimac T, Mantovani A, Allavena P, Rukavina D. Tumor associated glycoprotein-72 modulates phenotype and functional activity of decidual macrophages. 4th European Congress of Reproductive Immunology, Graz, Austria, July, 05-09. 2006. Am. J. Reprod. Immunol. 2006, Vol. 56, p23.

SAŽECI U ZBORNICIMA SKUPOVA

1. Bogovic Crncic T, Strbo N, Laskarin G, Sotosek Tokmadzic V, Cupurdija K, Juretic K, Dorcic D, Dupor J, Srsen S, Vlastelic I, Randic Lj, Rukavina D. Early pregnancy decidual lymphocytes lyse NK resistant targets by perforin and Fas/FasL mechanisms, Symposium and Postgraduate course 'Molecular and cellular interactions in chronic inflammatory autoimmune diseases', Belgrade, Serbia and Montenegro, Aug 29-Sep 02, 2004.

2. Srsen S, Laskarin G, Dupor J, Juretic K, Strbo N, Dorcic D, Cupurdija K, Sotosek-Tokmadzic V, Bogovic Crncic T, Haller H, Rupcic S, Randic LJ, Rukavina D. Phenotypic characteristics of leukocytes in ectopic pregnancy, Symposium and Postgraduate course 'Molecular and cellular interactions in chronic inflammatory autoimmune diseases', Belgrade, Serbia and Montenegro, Aug 29-Sep 02, 2004.
3. Juretić K, Štrbo N, Bogović Crnčić T, Dorčić D, Dupor J, Čupurdija K, Sršen S, Laškarin G, Randić Lj, Rukavina D. Lineage, maturity and phenotype of dendritic cells at human and murine maternal-fetal interface, 2004 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Opatija, Croatia, October 8-10, 2004.
4. Bogovic Crncic T, Strbo N, Laskarin G, Sotosek Tokmadzic V, Cupurdija K, Juretic K, Dorcic D, Dupor J, Srsen S, Vlastelic I, Raandic Lj, Rukavina D, The influence of Th1 cytokines on perforin and Fas/FasL mediated cytotoxicity of first trimester pregnancy decidual and peripheral blood lymphocytes, 2004 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Opatija, Croatia, October 8-10, 2004.
5. Sršen S, Laškarin G, Čupurdija K, Štrbo N, Dupor J, Bogović Crnčić T, Gašparović M, Veljković D, Randić LJ and Rukavina D, Tumor associated glycoprotein-72 (TAG-72) binds to mannose receptor on decidual macrophages and enables them to induce interleukin-4 production in naive T cells, 2004 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Opatija, Croatia, October 8-10, 2004.

6. Srsen S, Strbo N, Laskarin G, Sotosek Tokmadzic V, Bogovic Crncic T, Juretic K, Dupor J, Randic Lj, Rukavina D. Interleukin-15 produced by decidual adherent cells in vitro enhances perforin, Fas ligand and granzyme B expression in decidual lymphocytes. 1. EMBIC Summer school "Embryo implantation: from basics to clinics", Malinska, Croatia, June 4-10, 2005, abstract book
7. Veljković D, Laškarin G, Dupor J, Sršen Medančić S, Juretić Franković K, Mahmutefendić H, Gašparović M, Randić Lj, Saito S, Rukavina D. Granulysin expression in peripheral blood and decidua of the first trimester pregnancy, 2005 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Božava-Dugi otok, Croatia, September 29-October 2, 2005.
8. Juretic Frankovic, Koraljka; Laskarin, Gordana; Dupor, Jana; Strbo, Natasa; Bogovic Crncic, Tatjana; Bedenicki, Ivica; Srsen Medancic, Suzana; Veljkovic, Danijela; Randic, Ljiljana; Tabiasco, Julie; Le Bouteiller, Philippe; Rukavina, Daniel. Human decidual NK cells mediated lysis of K562 transfected cells // Abstract book Molecular Mechanisms of Implantation, Second EMBIC Summer School / Szekeres Bartho, Julia. Pećuh : Sveučilište u Pećuhu, 2006. 35-35 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
9. Veljkovic, Danijela; Laskarin, Gordana; Dupor, Jana; Srsen Medancic, Suzana; Juretic Frankovic, Koraljka; Mahmutefendic, Hana; Gasparovic, Milena; Stimac, Tea; Saito, Sigeru; Tabiasco, Julie; Le Bouteiller, Philippe; Rukavina, Daniel. Granulysin expression and localisation in the first trimester pregnancy decidua. Abstract book Molecular Mechanisms of Implantation, Second EMBIC Summer School /Szekeres-Bartho, Julia (ur.). Pećuh : Sveučilište u Pećuhu, 2006. 41-41 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

10. Batinica S, Luetic T, Antabak A, Cavar S, Bogovic M, Srsen S, Ille J, Dumic M.
Rekonstrukcija perineuma u djece s dvosmislenim spolovilom, 5th Croatian
Congress of pediatric surgery, Cavtat april 25-8, 2007.(poster,sažetak,
znanstveni)
11. Batinica S, Fiolic Z, Vukovic J, Luetic T, Antabak A, Cavar S, Kukin D, Bogovic
M, Srsen S. Valjanost Portosistemskih anastomoza u djece, 5th Croatian
Congress of pediatric surgery, Cavtat april 25-8
2007.(poster,domaćarecenzija,sažetak,znanstveni)
12. Srsen Medancic S, Bogovic M, Cavar S, Antabak A, Luetic T, Kukin D, Ille J,
Dumic M, Batinica S, Surgical treatment of thyroid gland disease in children,
an overview of our patients, 5th Croatian Congress of pediatric surgery, Cavtat
april 25-28, 2007. (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni)
13. Bogovic M, Cavar S, Antabak A, Luetic T, Kukin D, Srsen S, Dujmovic A,
Batinica S, Tumori medijastinuma u dječjoj dobi – iskustvo Zavoda za dječju
kirurgiju KBC-a Zagreb, 5th Croatian Congress of pediatric surgery, Cavtat
april 25-28, 2007. (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni)
14. Antabak A, Đapić T, Luetić T, Ćavar S, Bogović M, Sršen Medančić S, Batinica
S, Kukin D, Prijelomi kostiju dječje dobi – lođi ishodi lijećenja, 5th Croatian
Congress of pediatric surgery, Cavtat april 25-28, 2007. (poster,domaća
recenzija,sažetak,znanstveni)
15. Ćavar S, Bogović M, Antabak A, Luetić T, Fiolić Z, Kukin D, Sršen S, Dujmović
A, Vuković J, Batinica S. Tumori Jetre-Prikaz bolesnika, 5th Croatian
Congress of pediatric surgery, Cavtat april 25-28, 2007. (poster,domaća
recenzija,sažetak,znanstveni)

16. Sršen Medančić, Suzana; Laškarin, Gordana; Redžović, Arnela; Vlastelić, Ivan; Haller, Herman; Allavena, Paola; Mantovani, Alavena; Rukavina, Daniel. Mucin I tune cytolytic mediators expression in decidual CD56+ cells via decidual CD14+ cells // Book of Abstracts / Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (ur.). Moskva : MEDI Expo 2008, 2008. 32-33 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
17. Laskarin, Gordana; Srsen-Medancic, Suzana; Redzovic, Arnela; Vlastelic, Ivan; Rukavina, Daniel. Međudjelovanje decidualnih stanica NK i CD14+ antigen predočnih stanica pod utjecajem mucina 1 Zornik radova/Abstracts book. Stipić Marković, Asja, Čvorišćec, Branimir. Zagreb, Hrvatska: Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju, 2009. 127-128 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
18. Redzovic, Arnela; Laskarin, Gordana; Srsen Medancic, Suzana; Vlastelic, Ivan; Rukavina, Daniel. Utjecaj proteina toplinskog stresa 70 na decidualne dendritičke CD1a+ stanice iz prvog trimestra normalne humane trudnoće. Zbornik Radova/Abstracts Book. Stipić Marković, Asja, Čvorišćec, Branimir. Zagreb, Hrvatska: Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju, 2009. 141-142 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
19. Srsen Medancic, Suzana; Laskarin, Gordana; Redzovic, Arnela; Vlastelic, Ivan; Rukavina ,Daniel. Decidualne CD14+ antigen predočne stanice jesu alternativno aktivirane Zbornik Radova/Abstracts Book / Stipić Marković, Asja ; Čvorišćec, Branimir (ur.). Zagreb : Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju, 2009. 143-144 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni)

POHAĐANJE TEČAJEVA, LJETNIH ŠKOLA, MEĐUNARODNIH I DOMAĆIH SKUPOVA

1. 29. svibnja 2004. tečaj o statističkoj metodologiji medicinskog istraživanja
2. 30. lipnja - 3. srpnja 2004., Plzen, Češka – Europski kongres reproduktivne imunologije
3. 29. kolovoza – 2. rujna 2004., Beograd, Simpozij i poslijediplomski tečaj autoimunih bolesti
4. 8. - 10. listopada 2004., Opatija - Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva
5. 15. - 19. studenoga 2004., Zagreb - Vukovar, Prvi kongres hrvatskih znanstvenika iz domovine i inozemstva
6. 4. - 10. lipnja 2005., Malinska - 1. EMBIC Ljetna škola "Embryo implantation: from basics to clinics"
7. 25.-28. travnja 2007. Cavtat - 5th Croatian Congress of pediatric surgery,
8. 20.-22. svibnja 2009. Zagreb – Prvi hrvatski kongres alergologa i kliničkih imunologa
9. 1.-3. ožujka 2011. Zagreb – Tečaj laparoskopske kirurgije za dječje kirurge

NASTAVNA DJELATNOST

1. 1999. – 2003. Student - Demonstrator na Zavodu za Anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci
2. Od 2004. do 2006. godine aktivno sam sudjelovala u nastavi u izvođenju seminara i vježbi iz predmeta Fiziologija, Imunologija, Neurofiziologija, Patofiziologija za studente sveučilišnih studija opće medicine i stomatologije, te predmeta Fiziologija s patofiziologijom za studij diplomiranih sanitarnih inženjera. Suradnik sam u nastavi predmeta i za kolegije viših smjerova na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.